



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

**SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA ADENOVÍRUS HUMANOS
E SÍMIOS EM ADULTOS SAUDÁVEIS DOS ESTADOS DO ACRE E SANTA CATARINA: POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES PARA UMA VACINA RECOMBINANTE CONTRA HIV-1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto
à disciplina BIO5156 - Estágio II - como requisito
parcial para obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas.

JONATAN ERSCHING

Orientador: Professor Doutor Aguinaldo Roberto Pinto
Co-Orientador: Professor Doutor Carlos Roberto Zanetti

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

ERSCHING, Jonatan

Soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos e símios em adultos saudáveis dos Estados do Acre e Santa Catarina: possíveis implicações para uma vacina recombinante contra HIV-1 / Jonatan Ersching – Florianópolis (SC), 2009.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

49 p.:il – 21 cm. X 29,7 cm. (Trabalho de conclusão de curso – Centro de Ciências Biológicas)

1. Soroprevalência 2. Adenovírus 3. Vacinas 4. HIV-1

*“Um país não muda pela sua economia, sua
política e nem mesmo pela sua ciência;
muda sim pela sua cultura.”
Herbert de Souza (Betinho)*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto e co-orientação do Prof. Dr. Carlos R. Zanetti, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa Nacional de DST e Aids (PNDST/AIDS) do Ministério da Saúde.

Agradecimentos

Minha formação e a realização deste trabalho dependeram da colaboração de muitas pessoas, a quem dirijo meus sinceros agradecimentos. Em especial, agradeço:

Aos meus pais, Aldo e Silvia, pelo exemplo de caráter, pelas lições de humildade e por todos os sacrifícios que fizeram por mim. Obrigado por entenderem a minha ausência.

À minha irmã, Joyce, sempre tão doce e querida.

Ao meu orientador, Professor Aguinaldo Roberto Pinto, por estimular a minha independência e zelar por um ambiente de trabalho prazeroso e de respeito. Por investir na minha formação e me incentivar a seguir o caminho da Ciência. Pela preciosa e querida amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Carlos Zanetti, pela simplicidade, pelas críticas ao determinismo e defesa de uma postura mais humana no ambiente científico. Pelo agradável convívio.

À Professora Sônia Carobrez, minha primeira orientadora de iniciação científica, pelas portas sempre abertas.

Ao Professor André Báfica, pelo aprendizado e por me incentivar a me dedicar sempre mais.

À Professora Margherita Barracco, pela grande dedicação aos seus alunos, pelos conselhos e pela sabedoria.

Ao Professor Edelson Morato, pelos conselhos e conversas.

À Professora Malva Hernandez, pela ajuda com as análises estatísticas.

À Doutora Hildegund Ertl, pelos vírus recombinantes utilizados neste estudo, pelo seu trabalho na busca de uma vacina contra HIV-1, pelos artigos que me inspiram.

Aos 200 voluntários participantes deste estudo, muito obrigado.

Ao Professor Jovino Ferreira, por permitir a coleta de amostras no banco de sangue do Hospital Universitário da UFSC.

Ao enfermeiro Ericson, pela gentileza em fazer a punção do sangue dos voluntários em Santa Catarina.

Ao Fabrizzio, pela coleta e envio das amostras de soro oriundas do Acre.

Aos camundongos sacrificados para produção dos soros hiperimunes.

À Camila, Carol, Nana, Elis, Silvia, Gisele, Larissa, Fernando, Thiago, Ênio, Álvaro, Douglas, Yuri, Arthur, Luan e demais alunos do Laboratório de Imunologia Aplicada, obrigado pela amizade e bom humor que fazem o LIA tão agradável.

À Carol, pela ajuda com as amostras de Minas Gerais, infelizmente descartadas.

Ao Professor Bruna-Romero, da UFMG, pela troca de informações.

Ao CNPq e PNDST-Aids, pelo apoio financeiro.

Dedico este trabalho à memória de minha avó Ágata Stenger Ersching.

Saudades, Oma

RESUMO

Desde a década de 90 a indução de resposta imune celular vem sendo considerada no desenvolvimento de vacinas contra HIV-1, utilizando DNA e vírus recombinantes como vetores de antígenos. Dentre os vetores mais estudados estão adenovírus humanos, em especial o sorotipo AdHu5. No entanto, seres humanos são expostos a AdHu5 desde a primeira infância, produzindo anticorpos com capacidade de neutralizar este vírus. Altas concentrações de anticorpos neutralizantes previamente à vacinação com adenovírus recombinante podem resultar na falta de imunogenicidade e até em toxicidade da vacina. Para vencer este problema, adenovírus humanos de sorotipos raros ou adenovírus símios podem ser utilizados como vetores substitutos do AdHu5. O objetivo deste estudo foi avaliar os títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos (AdHu5 e AdHu26) e símios (AdC6 e AdC68) em indivíduos adultos saudáveis dos Estados do Acre e Santa Catarina. Para isto, empregaram-se adenovírus recombinantes em um ensaio de soroneutralização utilizando a proteína verde fluorescente como marcador de infecção celular. Observou-se que 77% das amostras exibiram anticorpos neutralizantes contra AdHu5, 51,5% contra AdHu26, 37% contra AdC6 e 35% contra AdC68. Apenas 42% das amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra AdHu5 em títulos menores do que 200, enquanto para AdHu26, AdC6 e AdC68 estes valores foram de 82,5%, 94,5% e 96%, respectivamente. Os títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos foram significativamente maiores no Estado do Acre do que em Santa Catarina, enquanto para adenovírus símios não houve diferença considerável entre estas regiões. Devido à baixa soroprevalência e baixos títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios, os resultados sugerem que estes vírus são boas alternativas para substituir AdHu5 no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra HIV-1.

Palavras-chave: soroprevalência, adenovírus, vacinas, HIV-1.

ABSTRACT

Since the 90's the induction of cellular immune response has been considered in the development of a vaccine against HIV-1, employing DNA and recombinant viruses as antigen vectors. Human adenoviruses figure among the most studied of these vectors, especially the serotype AdHu5. However, humans are exposed to AdHu5 since the early childhood and feature antibodies that may neutralize this virus. High concentrations of neutralizing antibodies prior to vaccination with recombinant adenovirus may result in lack of immunogenicity and even toxicity induced by the vaccine. To circumvent this drawback, rare human adenovirus serotypes and simian adenoviruses may be used as surrogate candidates to AdHu5. The aim of this study was to evaluate the neutralizing antibody titers against human (AdHu5 and AdHu26) and simian (AdC6 and AdC68) adenoviruses in healthy adult subjects from the States of Acre and Santa Catarina. To achieve this goal, recombinant adenoviruses were employed in a seroneutralization assay using the green fluorescent protein as a reporter of cellular infection. It was observed that 77% of the samples featured neutralizing antibodies against AdHu5, 51.5% against AdHu26, 37% against AdC6 and 35% against AdC68. Only 42% of the samples featured neutralizing antibodies against AdHu5 in titers lower than 200, whereas to AdHu26, AdC6 and AdC68 these values were 82.5%, 94.5% and 96%, respectively. The titers of neutralizing antibodies against human adenoviruses were significantly higher in the State of Acre than in Santa Catarina, whereas to simian adenoviruses there was no difference between regions. Since the seroprevalence and titers of neutralizing antibodies against simian adenoviruses were low, the results suggest that these serotypes are good alternatives to substitute AdHu5 in the development of an effective vaccine against HIV-1.

Keywords: seroprevalence, adenoviruses, vaccines, HIV-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
AdC	adenovírus símio (os números que acompanham esta abreviatura no texto indicam o sorotipo)
AdHu	adenovírus humano (os números que acompanham esta abreviatura no texto indicam o sorotipo)
DMEM	Meio Dulbecco modificado de Eagle (do inglês, <i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>)
<i>g</i>	aceleração da gravidade
<i>g</i>	grama
GFP	proteína verde fluorescente (do inglês, <i>green fluorescent protein</i>)
h	hora
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana tipo 1
kb	kilobase
mL	mililitro
n	número de amostras
nm	nanômetro
p	probabilidade
PBS	salina tamponada com fosfatos (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
PV	partículas virais
SFB	soro fetal bovino
SHIV	vírus HIV/SIV quimérico
SIV	vírus da imunodeficiência símia (do inglês, <i>simian immunodeficiency vírus</i>)
T	teste de Wilcoxon
U	teste de Mann-Whitney

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema e micrografia de partícula de adenovírus	3
Figura 2. Padrão de fluorescência do ensaio de soroneutralização.....	18
Figura 3. Soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos e símios	20
Figura 4. Distribuição de freqüências das amostras segundo o título de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos e símios.....	21
Tabela 1. Títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos e símios	22
Figura 5. Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos e símios	23
Figura 6. Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 segundo a procedência das amostras	24
Figura 7. Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu26, AdC6 e AdC68 segundo a procedência das amostras	25
Figura 8. Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 segundo gênero	26
Figura 9. Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu26, AdC6 e AdC68 segundo gênero	26
ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	43
ANEXO 2. Títulos de anticorpos neutralizantes de cada amostra.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O desafio de uma vacina eficaz contra HIV-1	1
1.2. Adenovírus: considerações gerais.....	2
1.3. Adenovírus recombinantes como vetores vacinais	4
1.4. Vacinas baseadas em adenovírus e a preexistência de anticorpos neutralizantes	7
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Geral	11
2.2. Específicos	11
3. METODOLOGIA	13
3.1. Considerações éticas.....	13
3.2. Amostras de soro humano.....	13
3.3. Vírus recombinantes	13
3.4. Linhagem celular	14
3.5. Produção de soro hiperimune	14
3.6. Padronização do ensaio de soroneutralização	15
3.7. Análise estatística dos resultados	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Padronização do ensaio de soroneutralização	18
4.2. Soroprevalência e títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus.....	19
4.3. Comparação da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes segundo a procedência das amostras	24
4.4. Comparação da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes segundo gênero	25
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES.....	33
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
8. REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. O desafio de uma vacina eficaz contra HIV-1

Entre as doenças infecciosas causadas por um único patógeno, as três responsáveis pelos maiores números de mortes no mundo são a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), tuberculose e malária (WHO, 2005). Dentre as três, AIDS é responsável pelo maior número de mortes, sendo a principal causa de óbitos entre indivíduos de 15 a 59 anos e a única doença sem cura até o momento. Desde o primeiro caso de AIDS, descrito em 1981 (Hymes et al., 1981), e a identificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) como seu agente etiológico em 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983), mais de 25 milhões de óbitos foram registrados e 33 milhões de indivíduos estão atualmente infectados com HIV (UNAIDS, 2008). Acredita-se, portanto, que o desenvolvimento de uma vacina preventiva eficaz e acessível seja a melhor opção para controlar a pandemia de HIV/AIDS.

A primeira geração de candidatos vacinais contra HIV-1 foi desenvolvida a partir da década de 80, utilizando peptídeos sintéticos para induzir anticorpos neutralizantes amplamente reativos contra diferentes subtipos virais (Esparza & Osmanov, 2003). Estes anticorpos, específicos contra epítomos da proteína gp120 do envelope viral, deveriam impedir a ligação inicial ou a fusão do HIV-1 nas células do hospedeiro, conferindo imunidade esterilizante. No entanto, a indução de anticorpos neutralizantes contra HIV-1 tem se mostrado extremamente difícil, com resultados desanimadores em um ensaio clínico de Fase III que utilizou esta estratégia (Suntharasamai et al., 2009). A enorme variabilidade da proteína gp120, sua baixa imunogenicidade, em parte devido à sua glicosilação, bem como o impedimento cinético e espacial do acesso de anticorpos a sítios vulneráveis para a ligação e/ou fusão viral constituem grandes obstáculos para a indução de anticorpos neutralizantes amplamente reativos contra HIV-1 (Burton et al., 2004). Por isso, a partir da metade da década de 90, uma nova geração de vacinas começou a ser desenvolvida.

Esta nova geração de vacinas surgiu após a constatação de que indivíduos que se infectam com HIV-1 e não desenvolvem AIDS, denominados controladores de elite, possuem células T citotóxicas HIV-específicas que mantêm a viremia baixa, bem como níveis

satisfatórios de células TCD4⁺, mesmo na ausência de anticorpos neutralizantes (Baker et al., 2009). Por isso acredita-se que uma vacina capaz de induzir células T citotóxicas específicas para antígenos conservados do HIV-1 permitiria a redução do pico inicial de viremia durante a infecção primária e/ou reduziria o nível estável de viremia na infecção crônica. Isto poderia controlar a progressão para AIDS, ainda que a vacina não fosse capaz de conferir imunidade esterilizante, pois células T não podem evitar a ligação e fusão do HIV nas células-alvo, tampouco destruir células de memória infectadas que funcionam como reservatórios virais (Heeney & Plotkin, 2006; Johnston & Fauci, 2007).

Vacinas contra HIV-1 que visam à indução de resposta imune mediada por células T citotóxicas utilizam vetores para carrear fragmentos de material genético que codificam antígenos virais, os quais devem ser sintetizados no citoplasma. Estes vetores podem ser DNA plasmidial ou vírus recombinantes, sendo os mais estudados poxvírus, alphavírus e adenovírus. Ensaios clínicos de Fase I mostraram que adenovírus figuram entre os vetores mais eficazes na geração de imunidade mediada por células contra HIV-1 (Priddy et al., 2008), superando a imunidade gerada por vetores de DNA (Gorse et al., 2008) ou mesmo poxvírus (Jaoko et al., 2008).

1.2. Adenovírus: considerações gerais

Em 1953 foram identificados agentes virais relacionados a infecções respiratórias agudas, exibindo efeito citopático nas adenóides humanas, os quais foram posteriormente denominados adenovírus (Rowe et al., 1953). Desde então, os vírus da família *Adenoviridae* têm sido isolados de grande variedade de espécies animais. O gênero *Mastadenovirus* é responsável pela infecção de mamíferos, enquanto *Aviadenovirus* infecta aves. *Atadenovirus* consiste de vírus isolados de ovinos, bovinos e algumas aves, sendo que recentemente foi proposto um quarto gênero, *Siadenovirus*, o qual engloba vírus isolados de anfíbios e alguns invertebrados (Davison et al., 2003).

Adenovírus são vírus líticos, não-envelopados com 70 nm de diâmetro (Horne et al., 1959). O capsídeo tem forma icosaédrica e consiste de três proteínas principais: hexon, penton e fibra. Um total de 240 hexons forma a maior parte da estrutura do capsídeo,

enquanto 12 vértices consistem de pentons ligadas a fibras (Figura 1). Estes vírus são espécie-específicos, com 51 sorotipos identificados em humanos e 27 em símios, dos quais 7 são específicos de chimpanzés. Os sorotipos humanos foram os mais estudados e, de acordo com suas características estruturais, bioquímicas, biológicas e imunológicas, foram divididos em seis subgrupos (A-F), sendo o subgrupo B subdividido em B1 e B2 (Tatsis & Ertl, 2004).

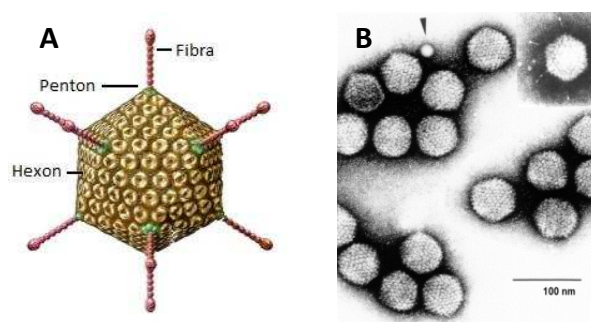


Figura 1. A. Representação de capsídeo adenoviral mostrando as proteínas do hexon, penton e fibra. B. Micrografia eletrônica de varredura de partículas adenovirais isoladas de adenóide humana. Adaptado de ICTVdB Management (2006). 00.001. Adenoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

A maioria das infecções por adenovírus é assintomática, mas em alguns casos manifestações clínicas podem ocorrer. Há adenovírus entéricos, como o sorotipo humano 41 (AdHu41), que causam diarreias, e AdHu26, que pode causar conjuntivites, e adenovírus não entéricos, como AdHu5, associado a infecções respiratórias. A transmissão de adenovírus entéricos e não entéricos se dá diretamente através do contato com pessoas infectadas, e indiretamente, por fômites, água contaminada e via fecal-oral. Além disso, partículas de adenovírus são resistentes à radiação UV, ozônio, pH ácido, cloro e calor, o que permite longa permanência no ambiente (Schlindwein, 2009).

O genoma adenoviral consiste de DNA linear dupla-fita, com cerca de 35 mil nucleotídeos divididos em duas regiões, precoce (*early*) e tardia (*late*) (Nevins, 1993). As regiões precoces (E1A, E1B, E2, E3, E4 e E5) codificam as proteínas dos chamados eventos

precoces, que ocorrem antes da replicação do material genético e atuam regulando a transcrição. A unidade E1A é a primeira a ser transcrita, e com a ajuda de fatores celulares, ativa a transcrição dos demais genes. Deleção da região E1A, portanto, produz vírus incapazes de replicação. Regiões tardias (L1-L5) são responsáveis pelos eventos que ocorrem durante ou após a replicação do genoma viral e codificam a maior parte das proteínas estruturais. Os produtos da transcrição destas seqüências tardias formam o capsídeo viral. Hexon, a mais abundante das proteínas do capsídeo, é codificada por L3. Enquanto a região do hexon mais próxima do capsídeo é altamente conservada entre os sorotipos adenovirais, a região mais distal, alvo dos anticorpos neutralizantes, é muito variável. O penton é codificado por L2 e é uma estrutura pentamérica onde se ligam trímeros da fibra, codificado por L5. Há também outras proteínas expressas em menor número que estabilizam o capsídeo (Rux & Burnett, 1999). Fibra é a proteína responsável pelo tropismo dos adenovírus, de modo que a maioria dos sorotipos utiliza o receptor de coxsackie e adenovírus, também podendo se ligar a moléculas como CD46, CD80, CD86 e ácido siálico (Arnberg, 2009).

1.3. Adenovírus recombinantes como vetores vacinais

Na década de 70, AdHu4 e AdHu7 atenuados foram empregados na imunização de recrutas norte-americanos contra doença respiratória aguda (Top et al., 1971). Como consequência dos resultados satisfatórios alcançados neste procedimento e por preencherem critérios de segurança e estabilidade, adenovírus foram posteriormente considerados na construção de vetores recombinantes vacinais (Pinto & Ertl, 2002).

Seqüências exógenas de até 1,8kb podem ser inseridas no genoma adenoviral sem necessidade de deleções, produzindo adenovírus recombinantes com capacidade de replicação. Não obstante, a maioria dos adenovírus recombinantes é construída através de deleções que aumentam a capacidade de inserção de DNA exógeno e por vezes modificam a biologia adenoviral. Três regiões do genoma, não-essenciais para a viabilidade viral, são utilizadas para a inserção de material genético exógeno: E1, E3 ou E4, com possibilidade de deleção dupla para grandes insertos. Uma vez que as regiões E1 e E4 são requeridas para a

replicação viral, a deleção destes genes resulta em partículas incapazes de replicação. Além da possibilidade de transmissão horizontal, adenovírus com capacidade de replicação completam ciclo lítico e após a liberação da progênie induzem apoptose, diminuindo assim a duração da apresentação de antígeno pela célula infectada (Tatsis & Ertl, 2004). Isto tem efeito negativo na indução de células T CD8⁺, estimuladas por antígenos sintetizados endogenamente, enquanto potencialmente favorece a ativação de células T CD4⁺, estimuladas por peptídeos derivados de degradação lisossômica. Alguns trabalhos relatam maior indução de células B e T CD8⁺ contra o transgene expresso por poxvírus recombinante não replicante do que em seu correspondente replicante, embora não exista tal informação acerca dos adenovírus (He et al., 2000). Vírus deletados da região E1 são propagados em cultura celular através da utilização de linhagens celulares complementares que expressam os produtos da região deletada E1, como as linhagens HEK293 e PERC6 (Pinto & Ertl, 2002).

O uso de adenovírus como vetor vacinal recombinante possui inúmeras vantagens. Adenovírus transduzem células apresentadoras de antígenos de forma eficiente e induzem forte resposta imune inata, o que potencializa a resposta imune adaptativa subsequente (Zhang et al., 2001). Por isto o emprego de adenovírus recombinantes em vacinas dispensa o uso de adjuvantes. O material genético adenoviral não se integra aos cromossomos da célula hospedeira, eliminando o risco de mutagênese por inserção (Bangari & Mittal, 2006). Outra vantagem é que o vetor adenoviral pode ser administrado através de diferentes vias de imunização tais como intravaginal, intranasal, oral, intratraqueal, intraperitoneal, intravenosa e intramuscular (Souza et al., 2005). Vetores adenovirais são estáveis e fáceis de manipular, facilmente purificáveis, obtidos em altos títulos e não exigem refrigeração quando liofilizados (Souza et al., 2005).

Um sorotipo que não está associado a sérias doenças e induz potente resposta imune celular e humoral, sendo por este motivo o mais estudado como carreador vacinal é AdHu5. Em modelos animais, AdHu5 recombinante tem se mostrado eficiente vetor vacinal, induzindo resposta imune protetora e específica contra antígenos de vários agentes infecciosos, como vírus rábico, vírus da dengue, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e vírus influenza (Pinto & Ertl, 2002; Tatsis & Ertl, 2004). Além disto, inúmeras vacinas contra HIV-1 utilizando o vetor AdHu5 induziram respostas imunes satisfatórias em animais. A

maioria das vacinas experimentais contra HIV-1 baseadas em adenovírus têm sido construída com o gene da proteína gag de HIV-1, pois esta é um alvo primário de células T CD8⁺ em indivíduos controladores de elite (Baker et al., 2009). Dada a relativa conservação das proteínas estruturais internas, tais como gag, estes antígenos representam um conjunto de prováveis alvos de reconhecimento para células T, além de terem sido associados com relatos de imunidade cruzada entre os diferentes subtipos de HIV. Em camundongos, uma vacina constituída de AdHu5 que codifica as proteínas gag e env do vírus *Friend murine leukemia virus* (retrovírus murino utilizado em modelo animal para simular a infecção por HIV) induziu redução da viremia e resposta de células T específicas após desafio com vírus patogênico (Bayer et al., 2008). Um vetor adenoviral quimérico dos sorotipos humanos 5 e 35 expressando a proteína gag de HIV-1 do grupo C induziu resposta cruzada contra HIV-1 do grupo B, tanto em camundongos quanto em chimpanzés (Xin et al., 2007). Outra vacina desenvolvida a partir de AdHu5 contendo o gene *gag* do vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês *simian immunodeficiency virus*) foi capaz de induzir proteção em primatas não-humanos contra desafio de uma cepa virulenta de vírus quimérico HIV/SIV (SHIV), bem como proporcionou controle mais eficiente da carga viral e manutenção das contagens de células T CD4⁺ quando comparada com vacinas de DNA ou vetores poxvírus (Shiver et al., 2002). Similarmente, outros estudos mostram que vacinas contra SIV carregadas por AdHu5 podem controlar a viremia em primatas após desafio (Casimiro et al., 2005; Wilson et al., 2006).

Estes estudos em animais fortaleceram o conceito de uma vacina que induz resposta imune celular contra HIV-1. Por isto, AdHu5 se tornou o candidato mais promissor para carrear antígenos do HIV-1 e induzir tais respostas imunes. Em seqüência, estudos clínicos de Fase I confirmaram os resultados obtidos em camundongos e chimpanzés, mostrando que vacinas contra HIV-1 baseadas em AdHu5 são imunogênicas em humanos, induzindo respostas citotóxicas em mais de 60% dos vacinados (Catanzaro et al., 2006; Priddy et al., 2008).

1.4. Vacinas baseadas em adenovírus e a preexistência de anticorpos neutralizantes

A exposição a adenovírus por vias naturais de infecção leva à ativação e diferenciação de linfócitos B que podem secretar anticorpos neutralizantes contra proteínas do capsídeo adenoviral. Destes anticorpos, 85 a 90% são específicos para epítomos localizados nos hexons, enquanto apenas 10 a 15% são direcionados contra outras proteínas, como pentons e fibras (Sumida et al., 2005). Apesar de AdHu5 ser altamente imunogênico e ter se mostrado promissor como vetor vacinal em estudos pré-clínicos e em ensaios clínicos de Fase I, efeitos indesejados causados pela presença de anticorpos neutralizantes previamente a imunizações com AdHu5 são amplamente relatados na literatura.

Estudos em primatas não-humanos mostraram que é necessária uma dose de AdHu5 recombinante 1.000 vezes maior em animais pré-expostos a AdHu5 para induzir uma resposta de células TCD8⁺ comparável àquela atingida em animais sem exposição prévia a AdHu5 (Casimiro et al., 2003). Uma vacina contra herpesvírus bovino não foi imunogênica em ratos com imunidade prévia a AdHu5, enquanto em animais sem imunidade prévia a adenovírus a vacina estimulou resposta imune específica (Papp et al., 1999). Similarmente, uma vacina contra coronavírus utilizando AdHu5 como vetor foi significativamente menos imunogênica em camundongos que exibiam altos níveis de anticorpos que neutralizavam AdHu5 do que em camundongos com baixos títulos destes anticorpos (Zhi et al., 2006). Pelo menos dois ensaios clínicos de terapia gênica, um contra câncer de pulmão (Gahéry-Ségard et al., 1997) e outro contra artrite reumatóide (Goossens et al., 2001), mostraram que em humanos a presença de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 impediu a transferência gênica do vetor AdHu5 recombinante. A administração de AdHu5 em doses mais elevadas poderia ser uma alternativa para evitar a neutralização do vetor por anticorpos, mas este aumento na dose pode levar a toxicidade letal, como já descrito em seres humanos (Marshall, 1999).

Diferentes abordagens têm sido empregadas na tentativa de superar a imunidade prévia a AdHu5. Uma delas consiste na modificação das regiões hipervariáveis que codificam a proteína do hexon de AdHu5, onde reside a maioria das diferenças entre os sorotipos adenovirais (Roberts et al., 2006). Esta modificação permite a substituição das regiões

reconhecidas pelos anticorpos neutralizantes sem perturbação da estrutura do capsídeo, preservando a estabilidade da partícula viral. Outra alternativa é a construção de vetores adenovirais recombinantes derivados de sorotipos humanos pouco prevalentes, contra os quais não se espera observar níveis elevados de anticorpos neutralizantes, apesar destes vírus serem imunogênicos (Thorner et al., 2006).

O uso de sorotipos de outras espécies, como adenovírus símios, que não circulam em populações humanas, também é uma boa opção para superar a barreira dos anticorpos neutralizantes (Xiang et al., 2002). Nove sorotipos de adenovírus símios são conhecidos, os quais transduzem de forma eficiente células humanas em cultura (Bangari & Mittal, 2006). Adenovírus símios isolados de chimpanzés apresentam crescimento, tropismo e utilização de receptores semelhantes aos de sorotipos humanos (Farina et al., 2001). Adenovírus símio do sorotipo 68 (AdC68), isolado de linfonodo mesentérico de chimpanzé, tem 90% de semelhança com AdHu4, mas as regiões hipervariáveis dos hexons são bastante distintas (Farina et al., 2001). Além disto, num estudo com camundongos, anticorpos neutralizantes contra AdHu5 não interferiram na resposta imune induzida por uma vacina construída a partir de um vetor símio (Xiang et al., 2003). Estudos pré-clínicos também mostram a indução de células citotóxicas por vetores AdC6 e AdC68 recombinantes expressando antígenos internos de HIV-1 (Pinto et al., 2004; Reyes-Sandoval et al., 2004; Souza et al., 2007), o que sugere que estes sejam bons candidatos para substituir AdHu5 na construção de uma vacina eficaz contra HIV-1.

Seres humanos são infectados por sorotipos comuns de adenovírus desde o início da vida e por isso podem apresentar níveis significantes de anticorpos neutralizantes contra estes vírus. De fato, estima-se que 35% a 60% da população dos Estados Unidos possuam anticorpos neutralizantes contra AdHu5, sendo que na África Subsaariana, região com maior índice de infecções pelo HIV, a população com altos títulos destes anticorpos chega a 90% (Farina et al., 2001; Sumida et al., 2005). Em um estudo na Nigéria, 89% das amostras de soro humano apresentaram anticorpos neutralizantes contra AdHu5, enquanto na Costa do Marfim este valor foi de 95% (Xiang et al., 2006).

Por outro lado, quando se avaliou a presença de anticorpos neutralizantes contra três sorotipos adenovirais símios (AdC68, AdC6 e AdC1) em populações americanas, tailandesas e

sul-africanas, verificou-se que apenas em africanos os títulos de anticorpos neutralizantes contra AdC6 e AdC1 estavam elevados, com amostras positivas em diluições $\geq 1:80$ em indivíduos da Nigéria e Camarões (Xiang et al., 2006). Na África Subsahariana, pessoas exibiram títulos de anticorpos neutralizantes contra AdC1 semelhantes aos títulos encontrados em chimpanzés. Acredita-se, porém, que a presença de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios seja bastante pequena na população mundial e estudos de soroprevalência tornam-se particularmente importantes para que vacinas utilizando vetores adenovirais símios, especialmente vacinas contra HIV-1, possam ser construídas com boas chances de eficácia. No entanto, dados sobre a presença de anticorpos neutralizantes contra adenovírus são praticamente inexistentes na América Latina e nenhum trabalho deste tipo foi publicado no Brasil.

O Brasil exibe o maior número absoluto de indivíduos soropositivos da América Latina. Por isto, o país tem interesse em participar do desenvolvimento de uma vacina capaz de controlar a pandemia de HIV/AIDS, havendo políticas públicas específicas para este fim que levaram o Brasil a participar de oito ensaios clínicos internacionais de vacinas contra HIV-1 (Ersching & Pinto, 2009). Além disto, a epidemiologia e patogênese da AIDS no Brasil são únicas, sendo um dos poucos países no mundo onde há circulação concomitante dos subtipos B e C de HIV-1 (Thomson & Nájera, 2005; Soares, 2008). É importante ainda destacar o fato da população brasileira exibir uma das maiores variações genéticas do mundo, formada por ameríndios, africanos e europeus (Pimenta et al., 2006). Portanto, o desenvolvimento de uma vacina contra HIV-1 para a população brasileira deve considerar as peculiaridades do país.

No caso de uma vacina contra HIV-1 ser vetorizada por um sorotipo adenoviral, é possível que a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra este vetor no Brasil seja também uma peculiaridade incomparável a outros locais. Por isso é importante o estudo da soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus de sorotipos que possam ser utilizados como vetores vacinais no Brasil. Ainda, deve-se considerar que o Brasil exibe proporções continentais e sua população apresenta contrastes genéticos, culturais e socioeconômicos. Assim sendo, estudos brasileiros de soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus no Brasil tornam-se mais representativos quando incluem

populações de diferentes regiões geográficas. Deste modo, o estudo da soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 e outros sorotipos humanos e símios em indivíduos dos Estados do Acre e Santa Catarina pode contribuir para o desenvolvimento de uma vacina de adenovírus recombinante eficaz contra HIV-1, bem como auxiliar no planejamento de políticas de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste estudo foi determinar e analisar os títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos (AdHu5 e AdHu26) e adenovírus símios (AdC6 e AdC68) em indivíduos brasileiros adultos saudáveis dos Estados do Acre e Santa Catarina.

2.2. Específicos

- a. Coletar 100 amostras de soro de doadores de sangue no Estado do Acre e 100 amostras no Estado de Santa Catarina.
- b. Produzir soro murino policlonal hiperimune contra adenovírus AdHu5, Ad26, AdC6 e AdC68.
- c. Padronizar um ensaio de soroneutralização.
- d. Determinar os títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 nas amostras de soro.
- e. Definir a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 no total das amostras e por Estado.
- f. Comparar a distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68.
- g. Comparar a distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 entre Estados.

- h. Comparar a distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 entre homens e mulheres.
- i. Determinar os sorotipos adenovirais contra os quais se observaram os menores títulos de anticorpos neutralizantes e menor variação destes títulos entre Estados e sexos.

3. METODOLOGIA

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (protocolo 113/07), Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo PP00068/CEUA) e pelo Comitê Interno de Biossegurança (protocolo 250/03), todos da Universidade Federal de Santa Catarina. Os voluntários foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e aqueles que demonstraram interesse em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

3.2. Amostras de soro humano

Neste estudo foram utilizadas 200 amostras de soro de indivíduos adultos com idades entre 18 e 65 anos, pesando mais de 50kg, saudáveis, doadores de sangue. Cem amostras foram coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Acre (Hemoacre), Rio Branco – AC, e cem amostras foram coletadas no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário da UFSC, Florianópolis – SC. Em cada Estado, as amostras foram coletadas de 50 indivíduos do sexo masculino e 50 do sexo feminino. As amostras foram obtidas ao final da doação de sangue por profissionais treinados, através da coleta de 3,5 mL de sangue periférico em tubos estéreis com gel de separação e livres de anticoagulante, devidamente numerados. Os tubos foram armazenados em geladeira a 4°C e posteriormente centrifugados a 1.000 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente para separação do soro, o qual foi coletado, aliquotado em capela de fluxo laminar e armazenado a -20°C.

3.3. Vírus recombinantes

Adenovírus recombinantes dos sorotipos AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 foram produzidos no Instituto Wistar, Filadélfia (EUA) através de deleção das seqüências E1/E3 do genoma viral e inserção de um fragmento codificante da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) utilizando recombinação homóloga com emprego de

plasmídios, de modo similar ao previamente descrito (Tatsis & Ertl, 2004). As partículas virais foram diluídas em salina tamponada com fosfatos de sódio e potássio (PBS) em concentrações de $5,0 \times 10^{12}$ a $2,0 \times 10^{13}$ PV/mL, aliquotadas e enviadas em gelo seco para o Laboratório de Imunologia Aplicada da UFSC, onde foram armazenadas a -80°C .

3.4. Linhagem celular

Células HEK293, fibroblastos humanos embrionários isolados de epitélio renal, aderentes, transfectados com a região E1 de AdHu5 (ATCC número CRL-1573) foram utilizadas no ensaio de soroneutralização. As células foram mantidas em meio *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), tamponado com 3,6 g de bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B, a 37°C em atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO_2 .

3.5. Produção de soro hiperimune

Soros policlonais hiperimunes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 foram produzidos para uso como controle positivo no ensaio de soroneutralização. Para cada sorotipo adenoviral, dois camundongos isogênicos da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, haplótipo H-2K^d, machos com 12 semanas de idade foram imunizados através da injeção de 1×10^{10} PV de adenovírus recombinante no músculo reto femoral da coxa. Após a imunização os animais foram marcados com solução picrato e mantidos em sala a 25°C , com provisão de água filtrada e ração *ad libitum*. Após 21 dias os animais receberam reforço, repetindo-se o mesmo procedimento da primeira imunização. No dia 40 após a primeira imunização os animais foram anestesiados e o sangue periférico foi coletado por punção retro-orbital. O sangue foi centrifugado a $1.000 \times g$ e o soro foi coletado do sobrenadante e aliquotado em capela de fluxo laminar e armazenado a -20°C .

3.6. Padronização do ensaio de soroneutralização

Para a determinação do título de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 de cada amostra de soro dos voluntários foi realizado um ensaio de soroneutralização. O princípio deste ensaio consiste na diminuição da infecção de células por um vírus devido à presença de anticorpos neutralizantes. Para isto, são incubados soro, vírus e células e a taxa de infecção viral das células é mensurada, uma vez que esta é inversamente proporcional à quantidade de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus. Como neste estudo foram empregados vírus recombinantes que expressam a proteína GFP, esta serviu como marcador de infecção. Não obstante, fatores como a concentração viral, tempo de incubação e número de células são importantes e influenciam na taxa de infecção celular (Mittereder et al., 1996). Por isto o teste de soroneutralização utilizado neste estudo foi previamente padronizado.

Para determinar o número de células da linhagem HEK293 a ser utilizado no ensaio, em uma placa de 96 cavidades de fundo plano foram incubadas de 1×10^4 a 1×10^5 células por cavidade, as quais foram mantidas por 24h a 37°C em atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O menor número de células que resultou em confluência da cavidade foi utilizado nos experimentos seguintes.

O número de PV/célula foi padronizado através da incubação de células HEK293 em placas de 96 cavidades de fundo plano com diferentes diluições de AdHu5, AdHu26, AdC6 ou AdC68 recombinantes. As diluições foram realizadas de forma seriada, de 8.000 PV/célula até 8 PV/célula. A maior diluição viral em que todos os sorotipos recombinantes foram capazes de infectar a maioria das células e expressar GFP sem provocar lise celular foi utilizada nos ensaios subsequentes.

Soro, vírus e células foram incubados a 37°C em atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂ por 24h e 48h. O tempo de incubação que permitiu expressão de GFP com menor efeito citopático foi empregado posteriormente.

No ensaio de soroneutralização amostras de soro foram colocadas em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação das proteínas do sistema complemento. Em placas de 96 cavidades com fundo plano estas amostras foram distribuídas em diluição seriada em

meio DMEM, perfazendo o volume de 50µL por cavidade. No primeiro ensaio de soroneutralização de cada amostra, as diluições de soro testadas foram 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Como controle positivo, utilizou-se soro policlonal hiperimune contra o sorotipo adenoviral a ser testado. O soro-controle foi também distribuído na placa de 96 cavidades de modo similar ao soro humano, porém foram testadas as diluições de 1:320, 1:640, 1:1.280, 1:2.560, 1:5.120, 1:10.240 e 1:20.480. Como controle negativo, foi utilizado meio DMEM. Em seguida, foram adicionados em cada cavidade 50µL de meio DMEM contendo adenovírus recombinante do sorotipo a ser testado. Em algumas cavidades, no entanto, não foram adicionados soro e partículas virais, mas apenas 100µL de meio DMEM, as quais serviram como controle celular. Após adição de vírus recombinante as placas foram incubadas por 1h a 37°C em atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂ para permitir a eventual neutralização das partículas virais. Em seguida, foram adicionados 100µL de uma suspensão de células HEK293 em meio DMEM adicionado de 5% de SFB. As placas foram então incubadas a 37°C em atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂ pelo tempo previamente padronizado. O meio foi descartado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. Em seguida, as cavidades foram lavadas com PBS, seguido da adição de 50 µL de Hoechst (corante fluorescente com afinidade por DNA) diluído a 5µg/mL em PBS. Após 1 minuto de incubação com Hoechst a temperatura ambiente, as cavidades foram novamente lavadas com PBS. Em seguida, as placas foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência em aumento de 40 vezes (Olympus BX41), onde se pôde observar o número total de células, coradas em azul por Hoechst (excitação 360nm, emissão 470nm) e o número de células infectadas pelo sorotipo de adenovírus recombinante testado, as quais expressam GFP, de cor verde (excitação 470nm, emissão 509nm). Os campos visuais foram fotografados com câmera digital colorida refrigerada (Q-imaging) e a taxa de células azuis/células verdes foi determinada utilizando o *software* Image-J. A recíproca da maior diluição onde se observou 50% de infecção em relação ao controle negativo foi tomada como o título de anticorpos neutralizantes .

Para validar os resultados obtidos no primeiro ensaio de soroneutralização, este foi repetido testando as diluições 1:15, 1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480 e 1:960 de soro dos voluntários. Quando o título obtido na repetição do teste foi próximo ao previamente

encontrado, o maior dos títulos foi considerado o título de anticorpos neutralizantes final do indivíduo. Quando menos de 50% de infecção por adenovírus recombinante foi observada nas diluições de 1:640 e/ou 1:960, o ensaio foi realizado novamente testando as diluições de soro humano de 1:320, 1:640, 1:1.280, 1:2.560, 1:5.120, 1:10.240 e 1:20.480 e repetido mais uma vez testando as diluições de 1:480, 1:960, 1:1.920, 1:3.840, 1:7.680, 1:15.360 e 1:30.720. Títulos superiores a 20 foram considerados positivos para a presença de anticorpos neutralizantes, de modo similar ao realizado em outros trabalhos (Xiang et al., 2006; Abbink et al., 2007).

3.7. Análise estatística dos resultados

Para a análise estatística da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos adenovirais testados foi utilizado o *software* Statistica 7. Para comparar a distribuição de títulos entre sorotipos foi aplicado o teste pareado de Wilcoxon. Para testar se houve diferença na distribuição dos títulos de modo dependente da procedência ou do sexo dos indivíduos foi aplicado o teste de Mann-Whitney. O intervalo de confiança adotado nestes testes foi de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do ensaio de soroneutralização

Para otimizar o ensaio de soroneutralização, o número de células e de partículas virais, bem como o tempo de incubação foram padronizados conforme descrito na seção anterior. Verificou-se que a incubação das amostras de soro com 2×10^4 células HEK293 e 500 PV de adenovírus recombinantes/célula a 37°C em atmosfera a 95% de umidade e 5% CO₂ por 24h resultou em confluência celular e um padrão de fluorescência que permitiram a determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes das amostras, sendo que o efeito citopático causado não foi suficiente para prejudicar a leitura dos títulos (Figura 2). Os soros policlonais hiperimunes utilizados como controle positivo neutralizaram 50% das partículas virais de AdHu5, AdHu26, AdC6 ou AdC68 na diluição de 1: 2.560.

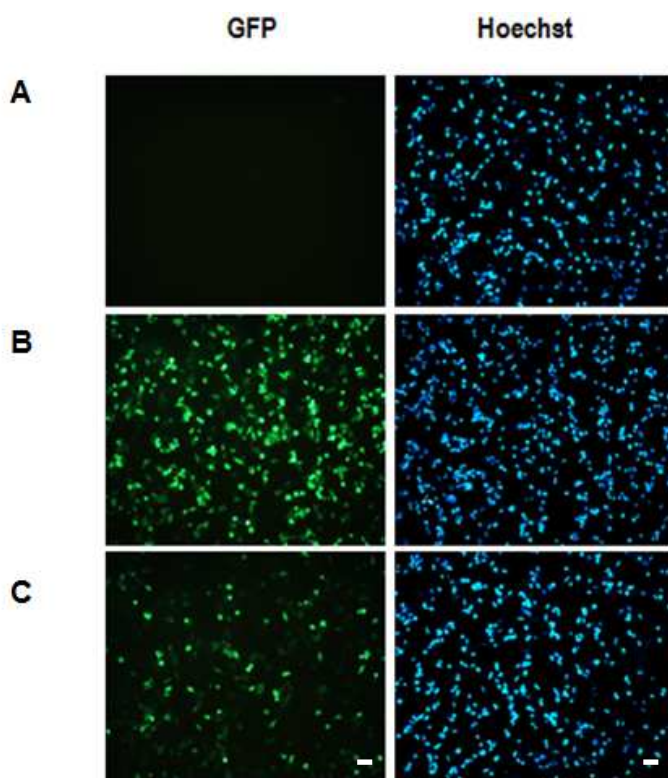


Figura 2. Padrão de fluorescência observado no ensaio de soroneutralização de adenovírus recombinante do sorotipo humano 5 que expressa a proteína verde fluorescente (AdHu5GFP) para detecção de anticorpos neutralizantes anti-AdHu5 presentes em amostras de soro de brasileiros adultos saudáveis. A. Controle positivo: soro murino policlonal hiperimune contra AdHu5GFP diluído 1:320. B. Controle negativo: ausência de soro. C. diluição de soro humano exibindo 50% de neutralização viral em relação ao controle negativo. Esquerda: células HEK293 infectadas, expressando GFP. Direita: células HEK293 coradas com Hoechst. Escala: 100µm.

Algumas amostras utilizadas neste estudo foram enviadas para o Instituto Wistar, Filadélfia (EUA) para comparação das metodologias. O emprego de um ensaio de soroneutralização naquela instituição utilizando os mesmos vírus recombinantes deste estudo resultou em títulos ligeiramente menores, porém similares aos obtidos neste trabalho (dados não mostrados). Portanto, pode-se afirmar que o ensaio padronizado para este estudo é sensível o suficiente para identificar a presença de anticorpos neutralizantes contra adenovírus em amostras de soro humano.

4.2. Soroprevalência e títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus

Soroprevalência refere-se ao percentual de indivíduos que têm positividade de anticorpos para determinado agente infeccioso. Para determinar a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68, empregou-se o ensaio de soroneutralização previamente padronizado, definindo-se como positivas as amostras cujos títulos de anticorpos neutralizantes foram superiores a 20. Como resultado, 77% de todas as amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra AdHu5, enquanto para AdHu26, AdC6 e AdC68 este valor foi de 51,5%, 37% e 35%, respectivamente (Figura 3). A soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus no Estado do Acre foi maior do que em Santa Catarina, exceto para AdC68, cuja soroprevalência de anticorpos neutralizantes foi superior em Santa Catarina (Figura 3).

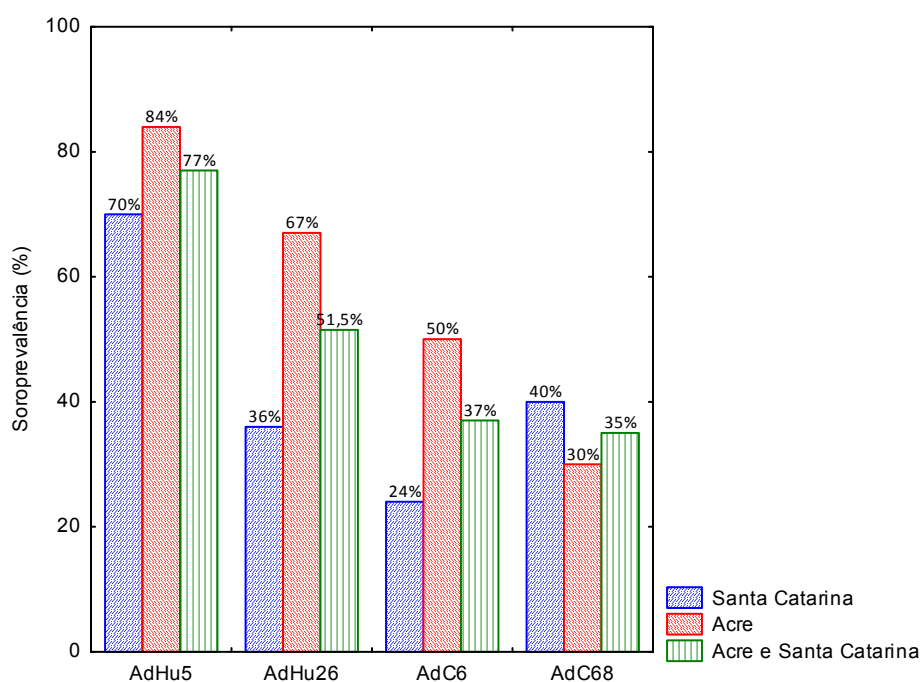


Figura 3. Soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos (AdHu5 e AdHu26) e símios (AdC6 e AdC68) nos Estados do Acre e Santa Catarina (n=200). Consideraram-se positivas as amostras cujo título de anticorpos neutralizantes foi superior a 20.

A análise qualitativa dos resultados do ensaio de soroneutralização através da classificação das amostras em positivas ou negativas para a presença de anticorpos neutralizantes contra diferentes sorotipos de adenovírus pode ser insuficiente para comparar a magnitude da ocorrência destes anticorpos na população, uma vez que amostras positivas podem apresentar desde títulos ligeiramente superiores a 20 e, portanto, muito baixos, até títulos superiores a 1.000, considerados muito altos. A Figura 4 apresenta a frequência absoluta de amostras em diferentes intervalos de títulos de anticorpos neutralizantes, mostrando que muitas amostras exibem títulos altos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, em maior frequência do que se observa para AdHu26, AdC6 ou AdC68, sendo AdHu5 o único sorotipo onde títulos superiores a 1.000 foram detectados (23% das amostras). Além disto, apenas 42% das amostras apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 menores do que 200, enquanto para AdHu26, AdC6 e AdC68 este valor foi de 82,5%, 94,5% e 96%, respectivamente.

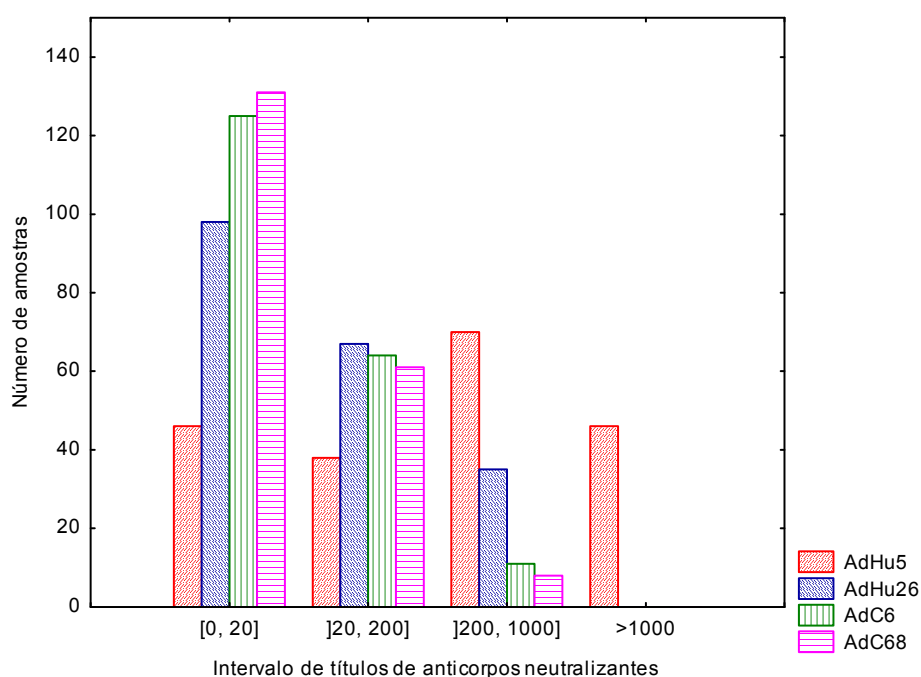


Figura 4. Distribuição de frequências das amostras de soro de indivíduos brasileiros adultos saudáveis dos Estados do Acre e Santa Catarina de acordo com os títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos (AdHu5 e AdHu26) e símios (AdC6 e AdC68) (n=200).

Apenas 30% das amostras foram relativas a indivíduos que exibiram títulos de anticorpos neutralizantes menores do que 200 simultaneamente contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68. Contra AdHu26, AdC6 e AdC68 simultaneamente, este percentual foi de 76,5%. Já considerando apenas adenovírus símios, 91% dos indivíduos apresentou títulos inferiores a 200 concomitantemente contra AdC6 e AdC68.

Para a análise quantitativa da presença de anticorpos neutralizantes contra adenovírus nas amostras, deve-se, portanto, considerar a distribuição dos títulos destes anticorpos. Esta distribuição foi não-paramétrica para todos os sorotipos de adenovírus testados. Os valores mais representativos deste tipo de distribuição são obtidos através da disposição das amostras em ordem crescente de títulos. Deste modo, o título da primeira amostra é o título mínimo e o da última amostra, o título máximo. O título do primeiro quartil é aquele cujo valor é igual ou inferior em 25% da população e igual ou superior em 75% da população. A mediana, por sua vez, é o título cujo valor é igual ou inferior em 50% da população e igual ou superior nos 50% restantes. Por fim, o segundo quartil é definido pelo título cujo valor é igual ou inferior em 75% da população e igual ou superior em 25% da

população. Como mostrado na Tabela 1, a maioria destes valores foi superior para AdHu5, em comparação com AdHu26, AdC6 e AdC68. O título máximo de anticorpos neutralizantes encontrado contra AdHu5 foi muito superior ao máximo obtido para os outros sorotipos adenovirais. Além disso, pelo menos 75% da população apresentou títulos de anticorpos neutralizantes iguais ou inferiores a 40 para adenovírus símios (quartil superior da Tabela1), enquanto para AdHu5 pelo menos 50% da população apresentou títulos de anticorpos neutralizantes iguais ou superiores a 320 (mediana da Tabela1).

Tabela 1. Valores representativos da distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos (AdHu5 e AdHu26) e símios (AdC6 e AdC68) em indivíduos brasileiros adultos saudáveis oriundos dos Estados do Acre e Santa Catarina (n=200).

Sorotipo	Título Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil Superior	Título Máximo
AdHu5	0	30	320	960	15.360
AdHu26	0	0	30	120	480
AdC6	0	10	20	40	960
AdC68	0	0	10	35	640

Denominam-se *outliers* valores muito menores do que o do quartil inferior ou muito maiores do que o do quartil superior que estão fora da série de distribuição, ou seja, são muito diferentes dos exibidos pelo resto da população. Neste estudo, para definição dos *outliers* foi considerado o coeficiente 1,5 da variação inter-quartis. A Figura 5 mostra a representação gráfica da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 sem considerar títulos *outliers*. Comparando os títulos máximos mostrados na Tabela 1 com os máximos da Figura 5, percebe-se que os maiores títulos encontrados para AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 foram *outliers*. Estes valores não foram excluídos das análises estatísticas, porém refletem que ocorrem variações extremas nos

títulos de anticorpos neutralizantes contra todos os sorotipos adenovirais testados na população deste estudo.

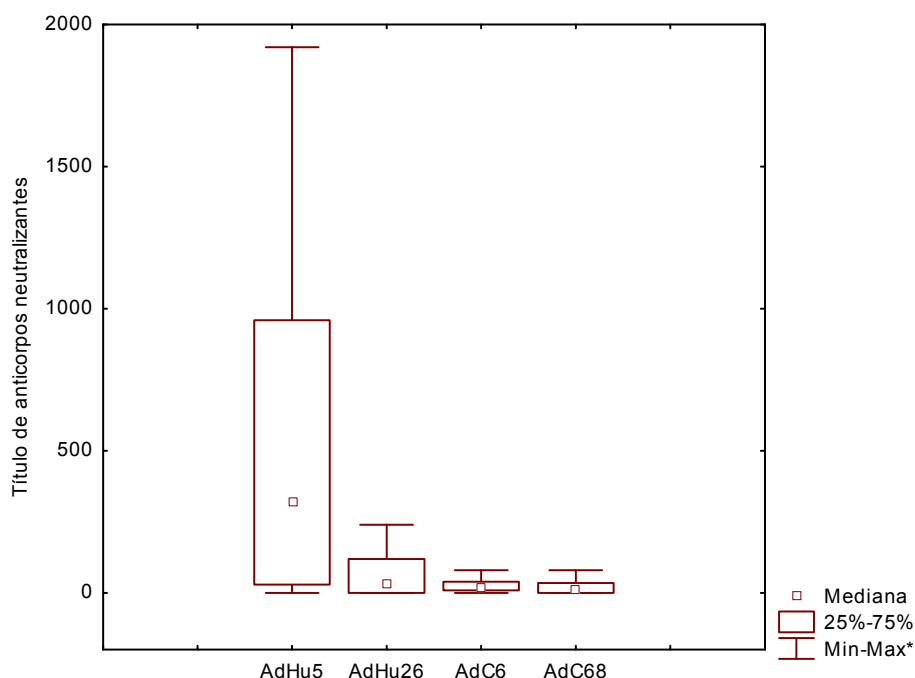


Figura 5. Distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos (AdHu5 e AdHu26) e símios (AdC6 e AdC68) em indivíduos brasileiros adultos saudáveis oriundos dos Estados do Acre e Santa Catarina. *Valores *outliers* não são mostrados.

Para comparar os títulos de anticorpos neutralizantes contra os diferentes sorotipos de adenovírus em cada indivíduo estudado aplicou-se o teste pareado de Wilcoxon. Assim, observou-se que há diferença significativa quando comparados os sorotipos AdHu5 e AdHu26 ($T=1550,5$ $n=200$ $p<0,001$), AdHu5 e AdC6 ($T=1715,5$ $n=200$ $p<0,001$), AdHu5 e AdC68 ($T=1122,5$ $n=200$ $p<0,001$), AdHu26 e AdC6 ($T=4775,5$ $n=200$ $p=0,001$) e AdHu26 e AdC68 ($T=3581,0$ $n=200$ $p<0,001$), porém entre os títulos de anticorpos neutralizantes contra AdC6 e AdC68 não houve diferença significativa ($T=5772,5$ $n=200$ $p=0,312$).

4.3. Comparação da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes segundo a procedência das amostras

Para testar se houve diferença entre as duas regiões avaliadas neste estudo quanto à distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra cada sorotipo estudado foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Deste modo, a distribuição dos títulos contra adenovírus humanos AdHu5 ($U=4093,5$ $n=200$ $p=0,027$) e AdHu26 ($U=3539,0$ $n=200$ $p<0,001$) foi significativamente distinta entre Acre e Santa Catarina, com títulos mais elevados no Acre. Já para os adenovírus símios AdC6 ($U=4510,0$ $n=200$ $p=0,23$) e AdC68 ($U=4405,0$ $n=200$ $p=0,15$) não houve diferença entre regiões na distribuição dos títulos, apesar das diferenças na prevalência mostradas na Figura 3. A distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 com as amostras separadas de acordo com a procedência é mostrada na Figura 6. O mesmo é mostrado para AdHu26, AdC6 e AdC68 na Figura 7.

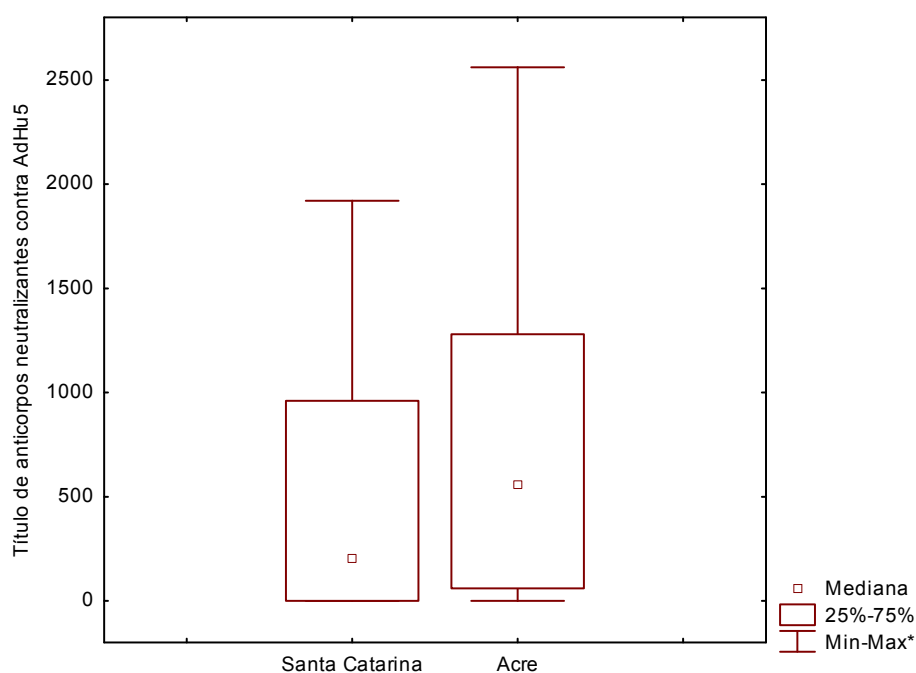


Figura 6. Distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 em indivíduos dos Estados do Acre e Santa Catarina de acordo com a procedência. * Valores *outliers* não são mostrados.

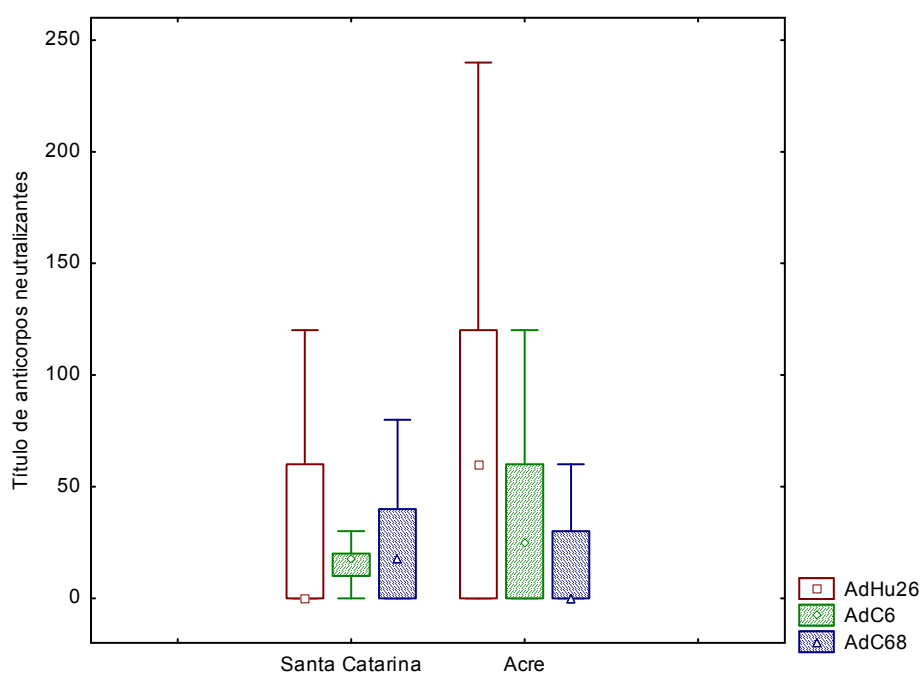


Figura 7. Distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu26, AdC6 e AdC68 em indivíduos dos Estados do Acre e Santa Catarina de acordo com a procedência. As barras indicam a variação entre títulos mínimos e máximos, as caixas indicam a variação inter-quartis e símbolos pequenos indicam a mediana. Valores *outliers* não são mostrados.

4.4. Comparação da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes segundo gênero

Para testar se houve diferença entre sexos quanto à distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra cada sorotipo estudado também foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A distribuição dos títulos contra os adenovírus AdHu5 ($U=4595,0$ $n=200$ $p=0,32$), AdHu26 ($U=4774,0$ $n=200$ $p=0,58$), AdC6 ($U=4621,0$ $n=200$ $p=0,35$) e AdC68 ($U=4476,5$ $n=200$ $p=0,20$) não variou significativamente entre homens e mulheres. A distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 com as amostras separadas de acordo com o sexo é mostrada na Figura 8 e o mesmo é mostrado para AdHu26, AdC6 e AdC68 na Figura 9.

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68 de cada amostra são apresentados no Anexo 2.

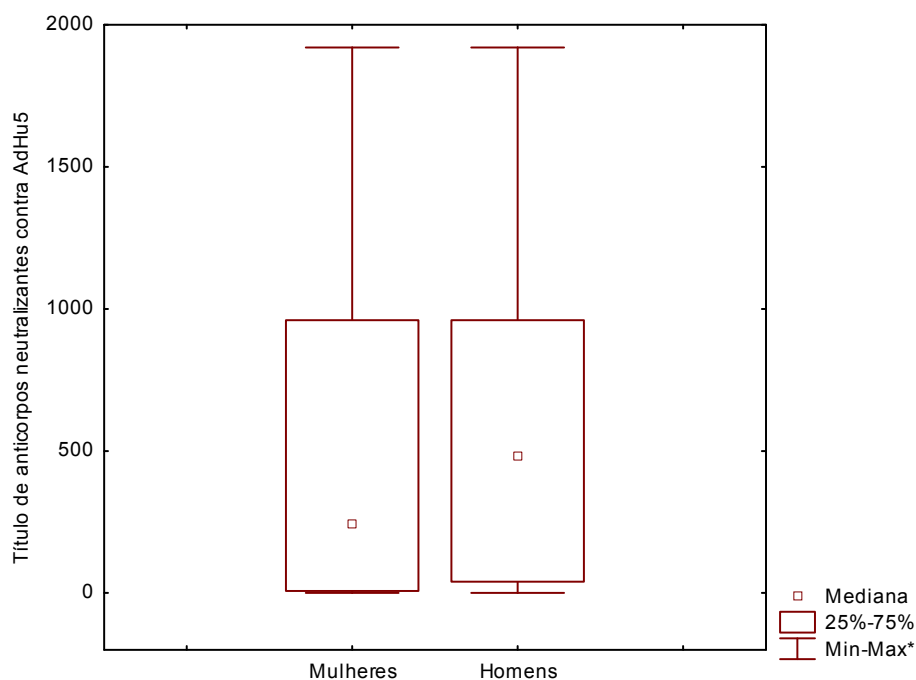


Figura 8. Distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 em indivíduos brasileiros adultos saudáveis oriundos dos Estados do Acre e Santa Catarina de acordo com o sexo. * Valores *outliers* não são mostrados.

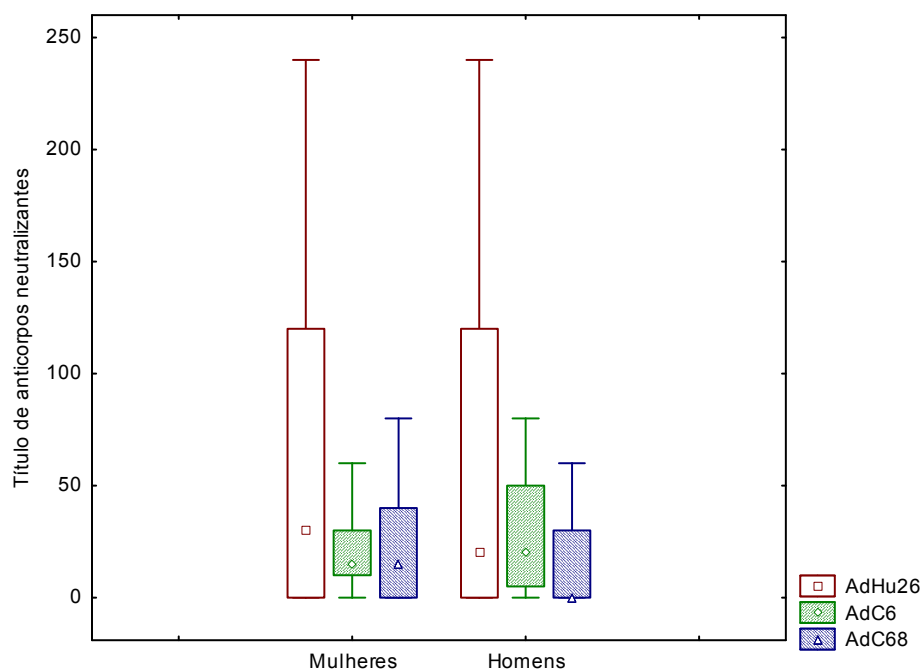


Figura 9. Distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu26, AdC6 e AdC68 em indivíduos brasileiros adultos saudáveis oriundos dos Estados do Acre e Santa Catarina de acordo com o sexo. As barras indicam a variação entre títulos mínimos e máximos, as caixas indicam a variação inter-quartis e símbolos pequenos indicam a mediana. Valores *outliers* não são mostrados.

5. DISCUSSÃO

A exposição a adenovírus, especialmente às proteínas do capsídeo viral, normalmente induz a ativação de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos secretores de imunoglobulinas com efeito neutralizante, atenuando a taxa de infecção celular quando da segunda exposição ao vírus (Yang et al., 1995). Efeitos indesejados da presença de anticorpos neutralizantes, como a redução da imunogenicidade de adenovírus utilizados como vetores vacinais recombinantes, são amplamente relatados na literatura (Papp et al., 1999; Casimiro et al., 2003; Zhi et al., 2006).

Os resultados deste estudo, similarmente aos publicados para outros locais, mostram que anticorpos neutralizantes contra AdHu5 são comuns nas pessoas. Foi constatada a presença de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 em 77% do total das amostras coletadas nos Estados do Acre e Santa Catarina (Figura 3), enquanto em um estudo realizado com 100 indivíduos dos Estados do Pará e Minas Gerais, 61% das amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra AdHu5 (Pereira, 2009). Portanto, com base nos estudos disponíveis, pode-se especular que no Brasil a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 supera 60%. Em outros países, principalmente nos mais pobres, a prevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 pode chegar a proporções ainda maiores do que no Brasil. Estes valores chegam a 84,67% na Gâmbia e 79,87% na África do Sul (Nwanegbo et al., 2004), 93% na Botsuana e Zâmbia e 82% no Haiti (Sumida et al., 2005). Já em países desenvolvidos, estes valores parecem ser menores, porém significativos, chegando a aproximadamente 35% nos EUA (Xiang et al., 2006) e 60% na Holanda (Kostense et al., 2004).

AdHu5 é responsável por infecções respiratórias agudas desde a primeira infância, sendo transmitido por aerossóis, materiais e água contaminados (Puzelli et al., 2009). Os vírus da família *Adenoviridae* são muito estáveis no ambiente e mesmo em condições adequadas de saneamento podem ser encontrados, uma vez que resistem a cloro, ozônio e radiação UV. Mesmo assim, diferenças na prevalência de anticorpos neutralizantes entre diferentes países podem estar relacionadas a questões sanitárias, pois a falta de saneamento facilita a transmissão dos vírus (Schlindwein, 2009). Isto pode também explicar

a diferença na ocorrência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos observada entre Acre e Santa Catarina, com maior prevalência e títulos mais altos no Acre (Figuras 3, 6 e 7). Enquanto na região Norte do Brasil apenas 67,6% da água distribuída recebe tratamento e 3,5% das residências de cidades com mais de 300.000 habitantes são ligadas à rede de esgoto, na região Sul este percentual é de 94,1% e 45,5%, respectivamente (IBGE, 2009). A inclusão de regiões tão diferentes em estudos que visam a caracterizar a distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus é, portanto, importante para que se obtenham dados que melhor representem o país como um todo.

A comparação de taxas de soroprevalência de anticorpos neutralizantes entre diferentes estudos deve considerar diferenças metodológicas. O princípio de todos os ensaios de soroneutralização é o mesmo: soro, vírus e células são incubados, permitindo que os anticorpos neutralizem as partículas virais, inibindo assim a infecção celular, a qual pode ser mensurada pela viabilidade das células ou taxa de expressão de um transgene usado como marcador, a exemplo da proteína GFP, da enzima luciferase, ou da fosfatase alcalina (Sprangers et al., 2003; Aste-Amézaga et al., 2004). Como há muitas formas de mensurar a taxa de infecção, comparações de resultados obtidos por diferentes metodologias são muito difíceis. Além disto, mesmo quando o marcador de infecção utilizado é o mesmo, fatores como a concentração viral, tempo de incubação e número de células são importantes e influenciam na taxa de infecção celular (Mittereder et al., 1996). Portanto, seria interessante o emprego de uma metodologia universal de um ensaio de soroneutralização para adenovírus que permita comparações mais uniformes entre diferentes taxas de prevalência de anticorpos neutralizantes. Apesar disto, os trabalhos publicados até o momento indicam alta soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 no mundo todo, o que reforça a necessidade de se buscar um vetor vacinal menos prevalente.

Apesar da ocorrência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, a partir de 2004 um ensaio clínico de Fase II-b, multicêntrico, duplo-cego e randomizado de um candidato vacinal contra HIV-1 baseado em AdHu5 foi realizado na América Latina, Estados Unidos, Canadá e Austrália, o qual foi chamado *Step Trial*. Esta vacina consistiu de uma mistura de três AdHu5 recombinantes que expressavam gag, pol ou nef de HIV-1. Em 2007, as vacinações foram suspensas no *Step Trial* porque verificou-se maior incidência de HIV-1

entre vacinados do que no grupo que recebeu placebo. Neste estudo, o efeito da neutralização de AdHu5 por anticorpos foi surpreendentemente menor do que o esperado (Hanke, 2008). O mais curioso, no entanto, é que entre os indivíduos vacinados que exibiam títulos prévios de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 maiores do que 200 foi observada a maior incidência de HIV-1 (Buchbinder et al., 2008; McElrath et al., 2008). Uma das hipóteses é que os anticorpos neutralizantes preexistentes formaram imunocomplexos com AdHu5 recombinante, agindo como opsoninas e desencadeando resposta imune que, em última análise, aumentou a população de células CD4⁺ permissivas a HIV-1 (Perreau et al., 2008). Seja pela capacidade de neutralizar o vetor, seja pela indução de respostas imunes indesejadas, o *Step Trial* reforça a idéia de que anticorpos neutralizantes contra adenovírus utilizados em vacinas recombinantes contra HIV-1 devem ser evitados. Por isto, estudos da ocorrência de anticorpos neutralizantes são necessários para definir a escolha do melhor vetor.

AdHu26 é um sorotipo humano raro de adenovírus entérico, quase não relatado na clínica médica e eventualmente associado a quadros de conjuntivite (Arnberg, 2009). A produção de partículas virais deletadas de E1/E3 para uso como vetor vacinal é uma alternativa possível para superar o problema da presença prévia de anticorpos neutralizantes. De fato, estudos conduzidos com amostras oriundas da África Subsaariana indicam a soroprevalência de aproximadamente 20% para anticorpos neutralizantes contra AdHu26 (Thorner et al., 2006; Abbink et al., 2007). Nesta região, enquanto 48% das amostras exibiam títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 1.000 contra AdHu5, os títulos contra AdHu26 em 96% das amostras foram menores do que 200 (Abbink et al., 2007). No trabalho aqui apresentado, verificou-se em aproximadamente 50% das amostras brasileiras a presença de anticorpos neutralizantes contra AdHu26 (Figura 3). Apesar desta elevada proporção, os títulos de anticorpos neutralizantes foram significativamente inferiores aos observados para AdHu5 (Figuras 4 e 5). Enquanto para AdHu5 23% das amostras exibiram títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 1.000 e 42% apresentaram títulos inferiores a 200, para AdHu26 nenhuma amostra superou o título de 1.000 e 82,5% exibiu títulos menores do que 200 (Figura 4).

Um vetor adenoviral recombinante ideal para uso em vacinas, além de pouco prevalente deve ser imunogênico. Apesar de não superar a imunogenicidade de AdHu5, AdHu26 é um dos sorotipos de adenovírus humanos raros mais imunogênicos que se conhece, de modo que um vetor recombinante expressando a proteína gag de HIV-1 baseado em AdHu26 superou a imunidade induzida por outros sorotipos humanos raros como AdHu11, AdHu35, AdHu48, AdHu49 e AdHu50, tanto em camundongos quanto em macacos *rhesus* (Abbink et al., 2007).

Acredita-se que AdC6 e AdC68 sejam adenovírus específicos de primatas do Velho Mundo pertencentes ao gênero *Pan*, popularmente conhecidos como chimpanzés (Tatsis & Ertl, 2004). Nestes animais, a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdC6 e AdC68 chega a quase 90%, principalmente na espécie *Pan troglodytes verus* (Farina et al., 2001; Xiang et al., 2006). No entanto, humanos não são conhecidos como hospedeiros dos sorotipos AdC6 e AdC68, normalmente exibindo soroprevalência de anticorpos neutralizantes inferior a 5%, mesmo quando há exposição ocupacional a chimpanzés, como ocorre com tratadores em zoológicos (Xiang et al., 2006). Apesar disto, em um estudo utilizando amostras de soro oriundas da Nigéria, Camarões e Costa do Marfim, habitat natural de chimpanzés, a prevalência de anticorpos neutralizantes contra AdC68 chegou a aproximadamente 10% e contra AdC6 a aproximadamente 20% (Xiang et al., 2006). Estes dados podem indicar que ocorre transmissão interespecífica de adenovírus símios do chimpanzé para o homem. Ainda que não ocorra infecção de humanos por adenovírus símios através de exposição ocupacional, é sabido que chimpanzés e homens são evolutivamente próximos e que outros vírus, como o retrovírus *simian foamy virus* pode ser transmitido de chimpanzés para pessoas (Calattini et al., 2004; Switzer et al., 2004).

Surpreendentemente, a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios AdC6 e AdC68 mostrada neste trabalho foi superior aos dados disponíveis para regiões endêmicas de chimpanzés. Conforme mostra a Figura 3, 37% e 35% das amostras apresentaram anticorpos que neutralizaram AdC6 e AdC68, respectivamente. Apesar disto, em Camarões, por exemplo, as médias de títulos de anticorpos neutralizantes contra AdC6 e AdC68 foram 109 e 82, respectivamente (Xiang et al., 2006). Sabe-se, que média não é um bom índice para descrever distribuições não paramétricas. Mesmo assim, as

médias obtidas no estudo africano são maiores do que as médias dos títulos obtidos neste estudo, que foram 88 para AdC68 e 51 para AdC6. Além disto, observou-se em 94,5% e 96% das amostras brasileiras que os títulos de anticorpos neutralizantes foram menores do que 200 contra AdC6 e AdC68, respectivamente (Figura 4). Ainda, os títulos de anticorpos neutralizantes observados contra os adenovírus símios neste estudo foram em pelo menos 75% das amostras inferiores a 40 (Tabela 1). O título 40 não é muito distante do título 20, considerado limiar para classificação das amostras como positivas. Portanto, embora amostras tenham sido consideradas positivas para a presença de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios, a maioria destas amostras apresentou títulos bastante baixos, próximos a valores considerados negativos.

Uma possível explicação para a neutralização de adenovírus símios em presença de soro das amostras deste estudo pode ser a reatividade cruzada de anticorpos contra adenovírus símios e humanos. De fato, reatividade cruzada de células do sistema imune adaptativo contra diferentes sorotipos adenovirais tem sido relatada (Mack et al., 1997) e a homologia entre hexons (proteína do capsídeo contra a qual reage a maioria dos anticorpos neutralizantes) varia de 65 a 81% entre adenovírus (Bailey & Mautner, 1994). No entanto, algumas amostras deste estudo apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes iguais a zero contra os adenovírus humanos enquanto contra os adenovírus símios os títulos foram positivos, por vezes superando 200. Amostras com altos títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus humanos e nulos contra adenovírus símios também foram observadas (Anexo 2). Estes dados enfraquecem a hipótese de que a presença de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios no Brasil se deva a neutralização cruzada.

Outra possibilidade é que adenovírus símios possam ser neutralizados por proteínas que não são anticorpos. Proteínas do complemento e fatores de coagulação podem estar relacionados à neutralização de partículas adenovirais (Pichla-Gollon et al., 2009). As amostras de soro utilizadas neste estudo foram obtidas após a coagulação do sangue e fez-se inativação do complemento por calor. Portanto, estas proteínas não devem ter neutralizado adenovírus símios. Apesar disto, a neutralização de adenovírus símios em altas diluições de soro, mostrada neste estudo, pode resultar da presença de outras proteínas

séricas que não são anticorpos e, similarmente ao observado para o complemento e fatores de coagulação, possuam atividade neutralizante.

Outra hipótese é que, de fato, a população brasileira exiba anticorpos neutralizantes contra adenovírus AdC6 e AdC68 devido a exposição a estes sorotipos. Como estes vírus são mais comuns em primatas não humanos do que em pessoas, é possível que AdC6 e AdC68 também circulem entre primatas neotropicais e estes animais transmitam adenovírus para humanos. Para testar esta hipótese, será realizado um estudo de soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdC6 e AdC68 no soro de primatas brasileiros. Por isto, foi estabelecida uma colaboração com o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros, João Pessoa - PB que fará a provisão de amostras de soro de diferentes espécies de primatas.

Não obstante, os títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios observados neste estudo foram significativamente inferiores aos observados contra AdHu5, e mesmo contra AdHu26 (Figura 4). Os dados do *Step Trial* sugerem que títulos prévios de anticorpos neutralizantes contra o vetor vacinal superiores a 200 podem ser um problema para a eficácia de uma vacina contra HIV-1 baseada em adenovírus. Como 94,5% e 96% das amostras deste estudo exibiram títulos de anticorpos neutralizantes menores do que 200 contra AdC6 e AdC68, respectivamente, o problema da preexistência de anticorpos neutralizantes não deve ser uma barreira considerável para a eficácia de uma vacina contra HIV-1 construída a partir de um adenovírus símio. Uma vez que esta proporção foi de 82,5% para AdHu26 e 42% para AdHu5, parece que entre os sorotipos testados neste estudo, os adenovírus símios seriam os vetores vacinais menos afetados pela presença de anticorpos neutralizantes.

6. Conclusões

Considerando todas as amostras, a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 foi de 77% e para AdHu26, AdC6 e AdC68 foi de 51,5%, 37% e 35%, respectivamente. Em Santa Catarina, no entanto, a soroprevalência de anticorpos neutralizantes foi de 70%, 36%, 24% e 40% contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68, respectivamente, enquanto no Acre este percentual foi de 84%, 67%, 50% e 30%, respectivamente.

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5 foram significativamente maiores do que os títulos contra os outros sorotipos, do mesmo modo que títulos contra AdHu26 foram significativamente maiores do que os títulos contra adenovírus símios. Entre AdC6 e AdC68 não foi verificada diferença considerável na distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes.

Anticorpos neutralizantes contra AdHu5 e AdHu26 ocorrem, de modo geral, em títulos mais altos no Acre do que em Santa Catarina, porém não há diferença entre regiões quanto à distribuição de títulos de anticorpos neutralizantes contra adenovírus símios AdC6 e AdC68.

Homens e mulheres apresentaram distribuição similar de títulos de anticorpos neutralizantes contra AdHu5, AdHu26, AdC6 e AdC68.

Entre os sorotipos empregados neste estudo, os adenovírus símios AdC6 e AdC68 exibiram menor prevalência e menores títulos de anticorpos neutralizantes e a distribuição destes títulos não variou entre regiões, tampouco entre sexos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora tenha sido buscada há mais de 25 anos, uma vacina eficaz contra HIV-1 ainda encontra-se no estágio de descoberta e não há garantias de que este objetivo será alcançado. Até o momento, mais de 100 ensaios clínicos de vacinas contra HIV-1 foram realizados sem nenhuma evidência clara de proteção induzida pela vacina. A grande diversidade de HIV-1, a habilidade do vírus em escapar de resposta imune protetora do hospedeiro, o precoce estabelecimento de reservatórios virais latentes e a falta de correlatos de proteção são as principais dificuldades encontradas no desenvolvimento da vacina. Mais do que procurar por novos vetores e realizar mais ensaios clínicos, o desenvolvimento de uma vacina contra HIV-1 carece de mais pesquisa básica para definição de correlatos seguros de proteção, considerando a importância de respostas humorais e celulares, bem como o papel da imunidade inata na proteção contra HIV-1. Desta forma, podem-se desenvolver novos antígenos que induzam tais respostas, para os quais adenovírus eventualmente serão empregados como carreadores.

Os resultados do *Step Trial* mostraram que a imunogenicidade de uma vacina baseada em adenovírus não foi relacionada com proteção contra HIV-1 e que pré-imunidade ao vetor vacinal tem efeitos negativos, podendo, mais do que reduzir a imunogenicidade da vacina, aumentar o risco de infecção por HIV. Por isso, o estudo de vetores símios, como sugere este trabalho, pode contribuir para vencer a pré-imunidade a adenovírus carreadores de antígenos de HIV-1.

Não obstante, os mecanismos que tornam a pré-imunidade a vetores adenovirais um problema para o emprego destes vírus em vacinas precisam ser melhor esclarecidos. O papel dos anticorpos neutralizantes na redução da imunogenicidade de vetores adenovirais tem sido o aspecto mais estudado da pré-imunidade a adenovírus, mas outros braços da resposta imune também merecem atenção. Por exemplo, anticorpos opsonizantes podem, teoricamente, reduzir a imunogenicidade de vetores adenovirais ao facilitar sua fagocitose e, além disso, desencadear resposta inflamatória contra o vetor. O papel das células TCD4⁺ e TCD8⁺ de memória específicas contra adenovírus também deve ser considerado no estudo das implicações da pré-imunidade a vetores vacinais. Mecanismos celulares e humorais da

imunidade inata, como a interação de células NK e proteínas do complemento com partículas adenovirais também pode ser interessante na compreensão da resposta imune a vetores vacinais baseados em adenovírus. Em conjunto, estes estudos podem fornecer informações mais completas que permitam a construção de vetores adenovirais mais eficientes em vacinas contra HIV-1, bem como para outros patógenos.

8. REFERÊNCIAS

- Abbink, P.; Angelique, A.C.L.; Bonnie, A.E. et al., 2007. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. **J Virol** 81: 4654-63.
- Arnberg, N., 2009. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. **Rev Med Virol** 19: 165-78.
- Aste-Amézaga, M.; Bett, A.J.; Wang, F. et al., 2004. Quantitative adenovirus neutralization assays based on the secreted alkaline phosphatase reporter gene: application in epidemiologic studies and in the design of adenovector vaccines. **Hum Gene Ther** 15: 293-304.
- Bailey, A. & Mautner, V., 1994. Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. **Virology** 205: 438-52.
- Baker, B.M.; Block, B.L.; Rothchild, A.C. et al., 2009. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. **Expert Opin Biol Ther** 9: 55-69.
- Bangari, D.S. & Mittal, S.K., 2006. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. **Vaccine** 24: 849-62.
- Barré-Sinoussi, F.; Cherman, J.C.; Rey, F. et al., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** 220: 868-71.
- Bayer, W.; Schimmer, S.; Hoffmann, D. et al., 2008. Evaluation of the friend virus model for the development of improved adenovirus-vectored antiretroviral vaccination strategies. **Vaccine** 26: 716-26.
- Buchbinder, S.P.; Mehrotra, D.V.; Duerr, A. et al., 2008. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double blind, randomized, placebo-controlled, test-of-concept trial. **Lancet** 372: 1881-93.
- Burton, D.R.; Desrosiers, R.C.; Doms, R.W. et al., 2004. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. **Nat Immunol** 5: 233-6.

- Calattini, S.; Maudere, P.; Tortevoe, P. et al., 2004. Interspecies transmission of simian foamy virus from chimpanzees and gorillas to Bantus and Pygmy hunters in southern Cameroon [abstract]. **Fifth International Foamy Virus Conference**. Würzburg, Alemanha.
- Casimiro, D.R.; Wang, F.; Schleif, W.A. et al., 2005. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing gag. **J Virol** 79: 15547–55.
- Casimiro, D.R.; Chen, L.; Fu, T.M. et al., 2003. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. **J Virol** 77: 6305-13.
- Catanzaro, A.T.; Koup, R.A.; Roederer, M. et al., 2006. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. **J Infect Dis** 194: 1638–49.
- Davison, A.J.; Benko, M.; Harrach, B., 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. **J Gen Virol** 84: 2895-908.
- Ersching, J. & Pinto, A.R., 2009. HIV-1 vaccine clinical trials: the Brazilian experience. **Rev Med Virol** 19: 301-311.
- Esparza, J. & Osmanov, S., 2003. HIV vaccines: a global perspective. **Curr Mol Med** 3: 183-93.
- Farina, S.F.; Gao, G.P.; Xiang, Z.Q. et al., 2001. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. **J Virol** 75: 11603-13.
- Gahéry-Ségard, H.; Molinier-Frenkel, V.; Boulaire, C.L. et al., 1997. Phase I Trial of Recombinant Adenovirus Gene Transfer in Lung Cancer. **J Clin Invest** 100: 2218-26.
- Goossens, P.H.R.; Vogels, R.; Pieterman, E. et al., 2001. The influence of synovial fluid on adenovirus-mediated gene transfer to the synovial tissue. **Arthritis Rheum** 44: 48-52.
- Gorse, G.J.; Baden, L.R.; Wecker, M. et al., 2008. Safety and immunogenicity of cytotoxic T-lymphocyte poly-epitope, DNA plasmid (EP HIV-1090) vaccine in healthy, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-uninfected adults. **Vaccine** 26: 215–23.

- Hanke, T., 2008. Step trial and HIV-1 vaccines inducing T-cell responses. **Expert Rev Vaccines** 7: 303-309.
- He, Z.; Wlaslo, A.P.; Kowalczyk, D.W. et al., 2000. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. **Virology** 270: 146-61.
- Heeney, J. L. & Plotkin, S. A., 2006. Immunological correlates of protection from HIV infection and disease. **Nat Immunol** 7: 1281-84.
- Horne, R.W.; Bonner, S.; Waterson, A.P. et al., 1959. The icosahedral form of an adenovirus. **J Mol Biol** 1: 84-6.
- Hymes, K.B.; Cheung, T.; Greene, J.B. et al., 1981. Kaposi's sarcoma in homosexual men: A report of eight cases. **Lancet** 2: 598-600.
- IBGE, 2009. **Pesquisa nacional de saneamento básico**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/defaulttab.shtm>. [Acesso 17 novembro 2009].
- Jaoko, W.; Nakwagala, F.N.; Anzala, O. et al., 2008. Safety and immunogenicity of recombinant low-dosage HIV-1 A vaccine candidates vectored by plasmid pTHr DNA or modified vaccinia virus Ankara (MVA) in humans in East Africa. **Vaccine** 26: 2788–95.
- Johnston, M.I. & Fauci, A.S., 2007. An HIV vaccine - evolving concepts. **N Eng J Med** 356: 2073-81.
- Kostense, S.; Koudstaal, W.; Sprangers, M. et al., 2004. Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. **AIDS** 18: 1213-16.
- Mack, C.A.; Song, W.R.; Carpenter, H. et al., 1997. Circumvention of antiadenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype. **Hum Gene Ther** 8: 99-109.
- Marshall, E., 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. **Science** 286: 2244-45.

- McElrath, M.J.; De Rosa, S.C; Moodie, Z. et al., 2008. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. **Lancet** 372: 1894-1905.
- Mittereder, N.; March, K.L.; Trapnell, B.C., 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. **J Virol** 70: 7498-509.
- Nevins, J.R., 1993. Transcriptional activity by the adenovirus E1A proteins. **Semin Virol** 4: 25-31.
- Nwanegbo, E.; Vardas, E.; Gao, W. et al., 2004. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of the Gambia, South Africa, and the United States. **Clin Diagn Lab Immunol** 11:351-7.
- Papp, Z.; Babiuk, L.A.; Baca-Estrada, M.E., 1999. The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. **Vaccine** 17: 933-43.
- Pereira, B.A., 2009. Frequência e capacidade de neutralização dos anticorpos contra adenovírus humano sorotipo 5 na população brasileira de Visconde do Rio Branco, MG e Santarém, PA. Dissertação (Mestrado). **Programa de Pós-graduação em Microbiologia**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Perreau, M.; Pantaleo, G.; Kremer, E.J., 2008. Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. **JEM** 24:2717-25.
- Pichla-Gollon, S.L.; Lin, S.W.; Hensley, S.E. et al., 2009. Effect of preexisting immunity on an adenovirus vaccine vector: in vitro neutralization assays fail to predict inhibition by antiviral antibody in vivo. **J Virol** 83: 5567-73.
- Pinto, A.R. & Ertl, H.C., 2002. Genetically modified adenoviruses as recombinant vaccines. **Current Topics in Virology** 2: 69-84.
- Pinto, A.R.; Fitzgerald, J.C.; Gao, G.P. et al., 2004. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen upon oral immunization of mice with a simian E1-deleted adenoviral vector. **Vaccine** 22: 697-703.

- Pimenta, J.R.; Zuccherato, L.W.; Debes, A.A. et al., 2006. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Hum Hered** 62: 190-5.
- Priddy, F.H.; Brown, D.; Kublin, J. et al., 2008. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. **Clin Infect Dis** 46: 1769–81.
- Puzelli, S.; Valdarchi, C.; Ciotti, M. et al., 2009. Viral causes of influenza-like illness: insight from a study during the winters 2004-2007. **J Med Virol** 12: 2066-71.
- Reyes-Sandoval, A.; Fitzgerald, J.C.; Grant, L. et al., 2004. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. **J Virol** 78: 7392-9.
- Roberts, D.M.; Nanda, A.; Havenga, M.J. et al., 2006. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. **Nature** 441: 239-43.
- Rowe, W.P.; Huebner, R.J.; Gilmore, L.K. et al., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med** 84: 570-3.
- Rux, J.J. & Burnett, R., 1999. **Adenoviruses: basic biology to gene therapy**. 7ed. Landes Bioscience: Georgetown.
- Schindwein, A. D., 2009. Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da estação de tratamento de esgoto (Sistema Insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral. Dissertação (Mestrado). **Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Shiver, J.W.; Fu, T.M.; Chen, L. et al., 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. **Nature** 415: 331-5.
- Soares, M.A., 2008. Drug resistance differences among HIV types and subtypes: a growing problem. **Future HIV Ther** 2:579-93.
- Souza, A.P.; Haut, L.; Reyes-Sandoval, A. et al., 2005. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Braz J Med Biol Res** 38: 509-22.

- Souza, A.P.; Haut, L.H.; Silva, R. et al., 2007. Genital CD8+ T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. **Vaccine** 25: 109-16.
- Sprangers, M.C.; Lakhai, W.; Koudstaal, W. et al., 2003. Quantifying adenovirus-neutralizing antibodies by luciferase transgene detection: addressing preexisting immunity to vaccine and gene therapy vectors. **J Clin Microbiol** 41:5046-52.
- Sumida, S.M.; Truitt, D.M.; Lemckert, A.A. et al., 2005. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. **J** 174: 7179-85.
- Suntharasamai, P.; Martin, M.; Vanichseni, S. et al., 2009. Factors associated with incarceration and incident human immunodeficiency virus (HIV) infection among injection drug users participating in an HIV vaccine trial in Bangkok, Thailand, 1999-2003. **Addiction** 104:235-42.
- Switzer, W.M.; Bhullar, V; Shanmugam, V. et al., 2004. Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. **J Virol** 78:2780-9.
- Tatsis, N. & Ertl, H.C., 2004. Adenoviruses as vaccine vectors. **Mol Ther** 10: 616-29.
- Thomson, M.M. & Nájera, R., 2005. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. **AIDS Rev** 7:210-24.
- Thorner, A.R.; Lemckert, A.A.C.; Goudsmit, J. et al., 2006. Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. **J Virol** 80: 12009-16.
- Top, F.H.; Grossman, R.A.; Bartelloni P.J. et al., 1971. Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. I. Safety, infectivity, antigenicity, and potency of adenovirus type 7 vaccine in humans. **J Inf Dis** 124: 148-54.
- UNAIDS, 2008. **Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008**. WHO: Geneva.
- WHO, 2005. **Bulletin of the World Health Organization**. WHO: Geneva.

- Wilson, N.A.; Reed, J.; Napoe, G.S. et al., 2006. Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. **J Virol** 80: 5875–85.
- Xiang, Z.; Gao, G.; Reyes-Sandoval, A. et al., 2002. Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product. **J Virol** 76: 2667-75.
- Xiang, Z.; Li, Y.; Cun, A. et al., 2006. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. **Em Inf Dis** 12: 1596-9.
- Xiang, Z.Q.; Gao, G.P.; Reyes-Sandoval, A. et al., 2003. Oral vaccination of mice with adenoviral vectors is not impaired by preexisting immunity to the vaccine carrier. **J Virol** 77: 10780-9.
- Xin, K.Q.; Sekimoto, Y.; Takahashi, T. et al., 2007. Chimeric adenovirus 5/35 vector containing the clade C gag HIV gene induces a cross-reactive immune response against HIV. **Vaccine** 25: 3809-15.
- Yang, Y.; Li, Q.; Ertl, H.C. et al., 1995. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. **J Virol** 69:2004-15.
- Zhang, Y.; Chirmule, N.; Gao, G.P. et al., 2001. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. **Mol Ther** 3: 697-707.
- Zhi, Y.; Figueredo, J.; Kobinger, G.P. et al., 2006. Efficacy of severe acute respiratory syndrome vaccine based on a nonhuman primate adenovirus in the presence of immunity against human adenovirus. **Hum Gene Ther** 17: 500-6.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia
88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil.

PROJETO DE PESQUISA

**ESTUDO DA SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA
SOROTIPOS ADENOVIRAIS CANDIDATOS A VETORES VACINAIS EM INDIVÍDUOS
BRASILEIROS ADULTOS**

RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores estão tentando desenvolver uma vacina contra o HIV, e nessa tentativa está sendo utilizado um outro tipo de vírus denominado adenovírus, que não causa AIDS. Os adenovírus possuem várias formas, chamados de sorotipos, e algumas dessas formas infectam seres humanos, enquanto outras infectam animais. As vacinas contra HIV que estão sendo desenvolvidas utilizam adenovírus que infectam pessoas e deram bons resultados em experimentos feitos em animais de laboratórios, porém ainda não sabemos se ela funcionará em seres humanos, uma vez que muitas pessoas entram em contato com estes adenovírus e desenvolvem mecanismos de defesas contra ele. Quando a pessoa desenvolve defesas contra adenovírus, ela produz anticorpos que ficam no sangue. Se estes anticorpos protegerem a pessoa contra o adenovírus utilizado na fabricação da vacina contra HIV, a vacina não deverá funcionar. Então, os pesquisadores precisam saber se as pessoas possuem anticorpos contra alguns sorotipos de adenovírus para tentar construir uma vacina que funcione contra o HIV em populações humanas.

Este projeto pretende pesquisar no sangue de pessoas brasileiras a presença de anticorpos contra sorotipos de adenovírus que estão sendo utilizados para construir vacinas contra o HIV. A sua participação neste estudo é muito importante, mas você pode decidir se quer participar ou não. Você está sendo convidado a participar deste estudo juntamente com muitas outras pessoas.

PROCEDIMENTO

Se o/a senhor(a) aceitar participar deste estudo, deverá autorizar a coleta de um pouco do seu sangue (3,5ml) para ser utilizado na pesquisa, e nada mais. Não haverá qualquer outro procedimento que possa ocasionar desconfortos para o participante, a não ser o desconforto da picada da agulha que coletará o sangue. O benefício deste estudo pode não ser imediato, mas ajudará pesquisadores que tentam desenvolver uma vacina contra o HIV, podendo proteger muitas pessoas contra a AIDS futuramente.

PARTICIPAÇÃO E CONFIDENCIALIDADE

A participação dos voluntários neste estudo é voluntária, confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação. Pense bem, faça as perguntas que desejar e esclareça suas dúvidas. Todos os itens deste termo de consentimento e informação serão cumpridos e respeitados pelos pesquisadores envolvidos. Se você tiver alguma dúvida ou mesmo depois de assinar este documento não quiser mais participar desta pesquisa, pode entrar em contato com qualquer um destes pesquisadores abaixo, comunicar sua decisão e, se assim o desejar, você será excluído da pesquisa:

- Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto - Universidade Federal de Santa Catarina – Fone: (048)3721-5206
- Jonatan Ersching – Universidade Federal de Santa Catarina – Fone: (048)3721.5514

CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações acima descritas. Foram explicados todos os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo que o meu sangue será utilizado na pesquisa de anticorpos contra adenovírus e esta pesquisa poderá trazer informações que ajudarão em pesquisas de vacinas contra HIV. Sei também dos possíveis desconfortos e benefícios com a participação neste estudo. Sou livre para autorizar ou não a minha participação neste estudo.

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o todo teor.

_____, _____ de _____ de 200____.
Local

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome completo do voluntário: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ CPF: _____

Pesquisador responsável _____

Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

Pesquisador principal _____

Jonatan Ersching

ANEXO 2

Amostra	Local de coleta	Sexo	Título de anticorpos neutralizantes			
			AdHu5	AdHu26	AdC6	AdC68
1	Florianópolis	F	240	20	20	30
2	Florianópolis	M	80	0	20	240
3	Florianópolis	F	240	0	20	60
4	Florianópolis	M	160	30	80	0
5	Florianópolis	M	10240	120	10	60
6	Florianópolis	M	640	40	40	15
7	Florianópolis	M	60	0	20	60
8	Florianópolis	F	0	120	40	0
9	Florianópolis	F	0	480	20	120
10	Florianópolis	M	0	240	20	10
11	Florianópolis	M	5120	0	40	10
12	Florianópolis	M	640	0	10	10
13	Florianópolis	F	3840	0	10	10
14	Florianópolis	F	80	60	40	160
15	Florianópolis	M	1920	0	40	20
16	Florianópolis	M	960	0	20	20
17	Florianópolis	M	40	0	480	20
18	Florianópolis	F	960	30	10	80
19	Florianópolis	F	960	0	20	15
20	Florianópolis	F	0	0	10	60
21	Florianópolis	M	30	0	160	60
22	Florianópolis	M	3840	0	10	0
23	Florianópolis	M	0	0	10	0
24	Florianópolis	F	960	40	20	60
25	Florianópolis	M	1920	0	20	0
26	Florianópolis	M	480	0	20	0
27	Florianópolis	F	0	0	30	30
28	Florianópolis	M	480	0	80	0
29	Florianópolis	M	120	160	10	0
30	Florianópolis	M	480	120	10	0
31	Florianópolis	F	3840	0	20	0
32	Florianópolis	M	1920	480	20	0
33	Florianópolis	F	2560	0	20	20
34	Florianópolis	F	640	480	20	30
35	Florianópolis	F	0	0	20	0
36	Florianópolis	M	960	0	10	30
37	Florianópolis	M	640	0	20	40
38	Florianópolis	M	480	480	10	0
39	Florianópolis	M	320	0	20	10
40	Florianópolis	M	0	0	15	30
41	Florianópolis	M	40	60	40	0
42	Florianópolis	M	320	20	0	0
43	Florianópolis	F	0	480	40	40
44	Florianópolis	F	120	120	240	20
45	Florianópolis	M	0	0	15	60
46	Florianópolis	M	480	0	15	60
47	Florianópolis	F	160	240	10	480
48	Florianópolis	M	0	20	40	40
49	Florianópolis	F	640	0	20	40
50	Florianópolis	F	0	0	10	0

Anticorpos neutralizantes contra adenovírus no Brasil

Amostra	Local de coleta	Sexo	Título de anticorpos neutralizantes			
			AdHu5	AdHu26	AdC6	AdC68
51	Florianópolis	F	640	0	15	0
52	Florianópolis	M	0	480	20	0
53	Florianópolis	F	20	320	80	40
54	Florianópolis	M	120	0	0	0
55	Florianópolis	F	1920	0	0	60
56	Florianópolis	M	480	60	15	40
57	Florianópolis	M	960	0	20	15
58	Florianópolis	M	160	0	10	30
59	Florianópolis	F	15	480	40	40
60	Florianópolis	F	960	0	10	0
61	Florianópolis	F	40	0	10	30
62	Florianópolis	F	0	0	10	0
63	Florianópolis	F	0	0	10	0
64	Florianópolis	M	1280	480	240	480
65	Florianópolis	M	960	0	10	0
66	Florianópolis	M	2560	20	10	0
67	Florianópolis	F	0	0	10	0
68	Florianópolis	F	7680	40	20	60
69	Florianópolis	M	40	120	320	0
70	Florianópolis	M	7680	0	40	30
71	Florianópolis	F	40	80	15	60
72	Florianópolis	M	3840	0	0	0
73	Florianópolis	M	0	0	30	40
74	Florianópolis	M	0	0	10	240
75	Florianópolis	M	40	0	20	60
76	Florianópolis	F	160	0	10	0
77	Florianópolis	F	0	60	60	0
78	Florianópolis	F	60	0	20	20
79	Florianópolis	M	480	30	30	20
80	Florianópolis	M	960	480	10	0
81	Florianópolis	F	0	0	40	0
82	Florianópolis	F	0	0	0	15
83	Florianópolis	M	3840	240	0	20
84	Florianópolis	M	320	40	0	0
85	Florianópolis	F	320	0	0	0
86	Florianópolis	F	320	0	10	0
87	Florianópolis	M	160	120	0	60
88	Florianópolis	F	320	0	0	0
89	Florianópolis	F	0	480	0	20
90	Florianópolis	M	0	0	0	0
91	Florianópolis	F	0	0	10	0
92	Florianópolis	F	30	0	0	20
93	Florianópolis	F	15360	0	20	10
94	Florianópolis	F	0	40	10	0
95	Florianópolis	F	7680	480	0	0
96	Florianópolis	F	0	0	0	30
97	Florianópolis	F	1920	0	0	0
98	Florianópolis	F	480	60	0	30
99	Florianópolis	F	0	0	20	30
100	Florianópolis	F	0	20	80	60

Amostra	Local de coleta	Sexo	Título de anticorpos neutralizantes			
			AdHu5	AdHu26	AdC6	AdC68
101	Rio Branco	F	960	240	30	240
102	Rio Branco	M	2560	120	15	0
103	Rio Branco	M	5120	30	30	60
104	Rio Branco	F	10240	60	30	0
105	Rio Branco	M	640	120	60	30
106	Rio Branco	M	960	0	0	30
107	Rio Branco	F	2560	40	60	0
108	Rio Branco	M	0	120	0	15
109	Rio Branco	M	240	120	60	0
110	Rio Branco	M	1280	15	60	0
111	Rio Branco	M	1280	60	30	0
112	Rio Branco	M	1280	480	120	15
113	Rio Branco	M	120	480	120	0
114	Rio Branco	M	2560	20	15	0
115	Rio Branco	M	0	0	0	0
116	Rio Branco	M	40	0	30	60
117	Rio Branco	M	960	30	30	120
118	Rio Branco	F	2560	30	30	0
119	Rio Branco	F	960	40	15	10
120	Rio Branco	M	2560	120	15	0
121	Rio Branco	M	640	0	960	0
122	Rio Branco	M	0	40	480	0
123	Rio Branco	M	1280	120	240	120
124	Rio Branco	M	320	20	120	20
125	Rio Branco	F	0	0	0	80
126	Rio Branco	M	320	80	120	0
127	Rio Branco	M	30	40	0	240
128	Rio Branco	M	0	40	60	160
129	Rio Branco	M	2560	60	120	30
130	Rio Branco	M	0	15	15	15
131	Rio Branco	M	960	20	10	15
132	Rio Branco	M	960	0	0	30
133	Rio Branco	M	5120	0	0	0
134	Rio Branco	F	960	15	0	120
135	Rio Branco	M	320	15	60	0
136	Rio Branco	M	0	240	60	640
137	Rio Branco	M	480	60	30	0
138	Rio Branco	M	640	30	30	0
139	Rio Branco	F	960	30	30	640
140	Rio Branco	M	960	120	160	0
141	Rio Branco	M	640	30	240	60
142	Rio Branco	M	320	240	0	0
143	Rio Branco	M	1280	0	0	0
144	Rio Branco	M	15	0	0	15
145	Rio Branco	M	0	480	30	0
146	Rio Branco	F	960	0	15	20
147	Rio Branco	F	15	60	0	10
148	Rio Branco	M	640	0	0	0
149	Rio Branco	F	2560	120	0	0
150	Rio Branco	F	960	0	15	30

Anticorpos neutralizantes contra adenovírus no Brasil

Amostra	Local de coleta	Sexo	Título de anticorpos neutralizantes			
			AdHu5	AdHu26	AdC6	AdC68
151	Rio Branco	F	0	120	60	120
152	Rio Branco	M	240	240	60	0
153	Rio Branco	F	960	30	30	10
154	Rio Branco	M	10240	30	0	0
155	Rio Branco	M	0	120	0	0
156	Rio Branco	M	60	480	0	0
157	Rio Branco	M	40	0	0	15
158	Rio Branco	M	80	0	960	30
159	Rio Branco	M	30	0	0	0
160	Rio Branco	F	0	60	120	0
161	Rio Branco	M	2560	120	80	0
162	Rio Branco	F	5120	60	30	0
163	Rio Branco	M	240	240	0	0
164	Rio Branco	M	960	60	0	0
165	Rio Branco	F	960	240	30	0
166	Rio Branco	M	960	0	30	0
167	Rio Branco	F	2560	240	30	0
168	Rio Branco	F	960	240	0	60
169	Rio Branco	F	10240	30	0	30
170	Rio Branco	M	60	0	0	0
171	Rio Branco	F	60	0	15	40
172	Rio Branco	F	160	30	120	0
173	Rio Branco	F	320	40	30	15
174	Rio Branco	F	1280	320	15	0
175	Rio Branco	F	240	60	15	0
176	Rio Branco	F	2560	0	0	0
177	Rio Branco	F	480	60	30	15
178	Rio Branco	F	2560	120	0	0
179	Rio Branco	F	30	480	40	60
180	Rio Branco	F	30	120	15	15
181	Rio Branco	F	60	0	0	30
182	Rio Branco	F	0	0	120	30
183	Rio Branco	F	320	240	20	0
184	Rio Branco	F	320	120	15	10
185	Rio Branco	F	240	0	15	0
186	Rio Branco	F	2560	120	40	120
187	Rio Branco	F	960	240	0	0
188	Rio Branco	F	120	240	15	60
189	Rio Branco	F	120	0	0	0
190	Rio Branco	F	240	240	640	10
191	Rio Branco	F	640	0	15	0
192	Rio Branco	F	2560	240	160	15
193	Rio Branco	F	120	120	40	60
194	Rio Branco	F	1280	60	15	15
195	Rio Branco	F	1280	60	0	0
196	Rio Branco	F	120	120	0	0
197	Rio Branco	F	0	120	30	120
198	Rio Branco	F	0	0	0	0
199	Rio Branco	F	30	240	480	0
200	Rio Branco	F	480	0	120	160